
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Investigação de infecção por
Chlamydophila pneumoniae
em crianças asmáticas por
Microimunofluorescência
e Elisa**

JAIRO FERNANDES DOS REIS JÚNIOR

Orientadora: Profa. Fátima Soares Motta Noronha

Belo Horizonte, Agosto 2009.

JAIRO FERNANDES DOS REIS JÚNIOR

**Investigação de infecção por
Chlamydophila pneumoniae
em crianças asmáticas por
Microimunofluorescência e Elisa**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Microbiologia da
Universidade Federal de Minas Gerais, ICB, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Orientadora: Profa. Fátima Soares Motta Noronha

Belo Horizonte, Agosto 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e Laboratório de soroimunologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Colaboradores

Haleta Evangelista de Lima

Pós-Doutoranda no Departamento de Microbiologia – ICB – UFMG

David Albanez Campos

Acadêmico do curso de medicina – Faculdade de Medicina UFMG

Apoio financeiro:

Fapemig, CNPq, Capes-PRPq/UFMG

“O Deus que fez o mundo e tudo o que nele existe... a todos dá a vida, respiração e tudo mais...”

Apóstolo Paulo em Atos 17:24-25

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela sua bondade e generosidade, por tornar possível esta conquista. A Ele, portanto, toda glória e todo louvor para todo sempre.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e não pouparem esforços para que eu pudesse caminhar passo a passo e sempre se alegram nas minhas conquistas como se fossem suas. Obrigado pai e mãe por me ensinarem princípios tão elevados de educação, moral e respeito.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo apoio, generosidade e disposição a ajudar. À Gabi, minha sobrinha, que foi uma grande companhia.

Ao meu sogro, Sr. Antônio e minha sogra, dona Neuza, pelo carinho e por me adotarem como filho e sempre prontos a cooperar em tudo. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse levar este trabalho adiante!

Aos meus cunhados, especialmente à Maria e seu marido Juninho, que muito nos ajudaram nos momentos mais difíceis. Muito obrigado por tudo!

Agradeço à tia Fiinha, que sempre se lembra de mim em suas orações e que sempre me ensina a humildade, o contentamento e a importância de uma vida simples.

Aos meus irmãos na Igreja de Cristo, que sempre torcem por mim e se colocam à disposição para apoiar. Obrigado por suas orações. Que Deus abençoe a vida de cada um.

Aos meus amigos e irmãos Luiz e Cirineu, vocês contribuíram muito ao me ajudarem a plantar as primeiras sementes desta conquista. À suas respectivas esposas, Tânia e Elci, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Aos meus amigos e colegas do laboratório do Hospital das Clínicas, especialmente na sorologia, Fred, Maira, Janice, Flávia, Danilo, Cláudia, Carla, Fátima, Lourdinha, Dra. Suzane que sempre me apoiaram, torceram por mim e muitas vezes fizeram mais do que eu merecia. Obrigado a todos, pelo carinho.

Aos meus amigos e colegas da Upa Nordeste, que também entenderam a importância deste trabalho. Obrigado ao gerente, Dr. Jayme que nunca criou qualquer obstáculo para que eu pudesse concluir as tarefas. Agradeço também a Alcione, pela sua competência e sua prontidão em atender as nossas solicitações.

Ao Instituto Hermes Pardini, especialmente a Dra. Darlene do setor de soroimunohematologia por permitir meu treinamento em lâminas de fluorescência.

À *Sayvion® Diagnostics Ltd, Ashdod, Israel*, por gentilmente e prontamente fornecer os kits de microimunofluorescência para realização dos testes.

À Greiner Bio-One GmbH – Vacuette, por gentilmente fornecer os tubos utilizados na coleta de sangue de cada paciente.

À Becton Dickinson (BD Vacutainer) por fornecerem gratuitamente as agulhas utilizadas na coleta de sangue dos pacientes.

À Rio Core representações, que gentilmente forneceu parte dos kits de Elisa necessários para os trabalhos.

À Haleta e Milena por serem generosas em contribuir. Aos colegas do Laboratório Labmic, Adriano, Camila, Gracielle, Maira, Ludmila, Jaqueline, Jordana, Juliana,

Matheus, Rafael Ramiro, Rafael Palhares e a professora Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli. Obrigado pelo apoio e convivência durante a realização deste trabalho. Aos amigos da pós-graduação, pela amizade e pela companhia durante esta trajetória.

Às professoras Dras. Maria Jussara Fernandes Fontes e Laura Lasmar por acreditarem na proposta de trabalho e tão generosamente permitirem que seus pacientes participassem deste estudo. Sem seu apoio e carinho não teria conseguido. A vocês minha admiração e respeito.

Ao professor Eugênio, que atenciosamente se disponibilizou a ajudar nos cálculos estatísticos e pelas suas sugestões que tanto contribuíram.

Ao David, acadêmico de medicina, que sempre estava presente nos momentos de coleta das amostras e foi tão útil.

Aos médicos, Dr. Márcio Belém, Dra. Tereza, Dra. Sílvia, por permitirem que seus pacientes também participassem da pesquisa e pela sua presteza em contribuir.

À professora Dra. Fátima Soares Motta Noronha, por acreditar em mim, pela orientação respeito e paciência durante todos os períodos. Sua ajuda foi fundamental e sem ela este trabalho jamais teria sido concluído. Todos os méritos são seus também!

À minha grande amiga Josiane, que não por acaso chamo de “minha anja da guarda”. Sem você Josi, eu jamais teria conseguido finalizar este projeto. Obrigado por ser uma amiga tão fiel e tão generosa. Esta conquista se deve muito ao seu esforço. Obrigado, mesmo!

À Adriana, minha esposa querida, que sempre valorizou nossas conquistas e nunca deixou de me apoiar em meus projetos. Se eu consegui chegar ao final,

querida, você contribuiu muito para isso. Obrigado pelo seu amor paciente. Amo você!

À pequena Alice, minha filha, que desde já vai aprender que o verdadeiro conhecimento vem de Deus. Você trouxe mais luz e inspiração à nossa vida!

Ao Douglas, pela sua atenção e disponibilidade em ajudar!

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos durante o período de mestrado.

A todas as pessoas de que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros Agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE ANEXOS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Classificação Taxonômica de <i>Chlamydiaceae</i>	25
2.2 Ciclo de desenvolvimento e características de <i>Chlamydiaceae</i>	26
2.3 <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	31
2.4 Manifestações clínicas da infecção por <i>C. pneumoniae</i>	32
2.5. Diagnóstico das Infecções por <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	34
2.5.1 Cultivo celular.....	34
2.5.2 Detecção de antígeno.....	35
2.5.3 Detecção de Anticorpos.....	36
2.5.3.1 Fixação do Complemento.....	36
2.5.3.2 Ensaio Imunoenzimático	37
2.5.3.3 Microimunofluorescência.....	37
2.5.4 Métodos moleculares para detecção de <i>C. pneumoniae</i>	40
2.6 Epidemiologia.....	41
2.7 <i>Chlamydophila pneumoniae</i> e Asma.....	43
3. JUSTIFICATIVA.....	47
4. OBJETIVOS.....	49
4.1 Objetivo Geral.....	50
4.2 Objetivos específicos.....	50
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
5.1 População Estudada	52
5.1.1 Critérios de Inclusão e Exclusão	53
5.2 Coleta da amostra Clínica.....	53
5.3 Sorodiagnóstico da infecção por <i>C. pneumoniae</i>	54

5.3.1 Microimunofluorescência	54
5.3.1.1 Pesquisa de anticorpos IgM	54
5.3.1.2 Pesquisa de anticorpos IgA e IgG.....	55
5.3.2 Pesquisa de anticorpos por Elisa.....	56
5.3.3 Determinação da sensibilidade e especificidade	58
5.4. Análise estatística dos dados.....	59
6. RESULTADOS.....	60
6.1 Caracterização da população estudada.....	61
6.2 Pesquisa sorológica da infecção por <i>C. pneumoniae</i>.....	63
6.2.1 Pesquisa de anticorpos anti <i>C. pneumoniae</i> por MIF.....	63
6.2.1.1 Pesquisa de IgA	63
6.2.1.2 Pesquisa de IgG	65
6.2.1.3 Pesquisa de IgM	66
6.2.2 Pesquisa de anticorpos anti <i>C. pneumoniae</i> por Elisa.....	69
6.2.2.1 Pesquisa de IgG e IgM.....	69
6.3 Uso de corticóide inalado e testes sorológicos positivos.....	72
7. DISCUSSÃO.....	74
7.1 Avaliação da pesquisa de anticorpos anti <i>C. pneumoniae</i> e metodologia utilizada.....	76
7.2 Avaliação da transmissão da infecção e caracterização da população estudada	83
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	89
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Mecanismo proposto para o ataque e entrada de <i>Chlamydia</i> nas células epiteliais.....	28
Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydiaceae</i>	30
Figura 3. Cinética dos anticorpos IgA, IgG e IgM na infecção aguda por <i>C. pneumoniae</i>	33
Figura 4. Célula hospedeira (linhagem BV-2) infectada por <i>C. pneumo-</i> <i>niae</i> após 72 horas	35
Figura 5. Reação positiva para <i>C. pneumoniae</i> em MIF.....	38
Figura 6. Interação de <i>C. pneumoniae</i> com diversos tipos celulares.....	44
Figura 7. Distribuição de pacientes conforme grupos de idades.....	52
Figura 8. Lâminas de vidro contendo antígenos de <i>C. pneumoniae</i> , <i>C.</i> <i>trachomatis</i> e <i>C. psittaci</i>	54
Figura 9. Reação de ELISA para pesquisa de anticorpos contra <i>C.</i> <i>pneumoniae</i>	57
Figura 10. Nº de pessoas asmáticas e não asmáticas que participaram da pesquisa no período de março a agosto de 2008.....	61
Figura 11. Distribuição de pacientes asmáticos e controle de acordo com localização da moradia	62
Figura 12a. Pesquisa de IgA anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos grupos asmáticos e controle	63
Figura 12b. Pesquisa de IgA anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos sexos masculino e feminino	63
Figura 13a. Pesquisa de IgG anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos grupos asmáticos e controle	65
Figura 13b. Pesquisa de IgG anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos sexos masculino e feminino	65
Figura 14a. Pesquisa de IgM anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos grupos asmáticos e controle	67
Figura 14b. Pesquisa de IgM anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por MIF nos sexos masculino e feminino	67

Figura 15a. Pesquisa de IgG anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por Elisa nos sexos masculino e feminino	69
Figura 15b. Pesquisa de IgG anti <i>C. pneumoniae</i> em indivíduos avalia - dos por Elisa nos grupos asmáticos e controle	69

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Resumo da classificação taxonômica proposta para a ordem <i>Chlamydiales</i>	26
Tabela 2. Comparação entre métodos diagnósticos para <i>C. pneumoniae</i>	41
Tabela 3. Avaliação da validade de um teste diagnóstico.....	59
Tabela 4. Comparação do título de IgA anti- <i>C. pneumoniae</i> por microimunofluorescência.....	64
Tabela 5. Comparação dos títulos de anticorpos IgG anti- <i>C. pneumoniae</i> presentes em amostras sorológicas por MIF em indivíduos asmáticos e controle.....	66
Tabela 6. Comparação dos títulos de anticorpos IgA, IgG e IgM anti- <i>C. pneumoniae</i> detectados por MIF em amostras de soro.....	68
Tabela 7. Comparação de resultados positivos entre MIF e Elisa.....	70
Tabela 8. Comparação resumida entre os dois métodos.....	71
Tabela 9. Comparação dos dois métodos de diagnósticos utilizados para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM anti- <i>C. pneumoniae</i> em amostras sorológicas.....	72
Tabela 10. Uso de corticóide inalado comparado aos resultados positivos de IgA, IgG, IgM em microimunofluorescência (MIF) ou Elisa em indivíduos asmáticos.....	73

LISTA DE ANEXOS:

Anexo 1. Termo de consentimento para pesquisa.....

Anexo 2. Questionário.....

Anexo 3. Protocolo de aprovação de projeto no COEP UFMG

LISTA DE ABREVIATURAS

.ATP	Adenosina trifosfato
CA	Corpos anormais
CE	Corpo elementar
CR	Corpo reticular
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DFA	Direct Fluorescence Antibody
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRC	Doença Respiratória Crônica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EIA	Enzima imunoensaio
FC	Fixação de Complemento
FDA	Food and Drug Administration
GAG	Glicosaminoglicano
GTP	Guanosina trifosfato
HC	Hospital das Clínicas
ICC	Imunocitoqímica
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Kilobases (10^3 pb)
Kda	QuiloDalton (10^3 Da)
LPS	Lipopolissacarídeo
MIF	Microimunofluorescência
mL	Mililitro (10^{-3} L)
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i> (Principal proteína de membrana externa)
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>open reading frame</i> (fase de leitura aberta)

PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Salina Tamponada com Fosfato)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Tampão Tris-Borato EDTA
UTP	Uracila trifosfato
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Volts
VD	Domínio variável
µg	Micrograma (10^{-6} g)
µL	Microlitro (10^{-6} L)

Resumo

A asma é uma desordem inflamatória crônica das vias aéreas associada a fatores ambientais, genéticos, imunológicos, ocupacionais, infecciosos, entre outros, que podem contribuir tanto para o aparecimento da doença, quanto para a exacerbação de seus sintomas. As infecções respiratórias desempenham papel importante na promoção dos danos teciduais observados na asma.

Chlamydophila pneumoniae é uma bactéria intracelular obrigatória associada a infecções do trato respiratório. Transmitida no contato pessoa-pessoa através de secreções das vias respiratórias tem sido associada a diversas condições respiratórias crônicas, entre elas a asma.

Neste trabalho avaliamos a frequência de anticorpos específicos anti-*C. pneumoniae* entre indivíduos asmáticos e não asmáticos e comparamos o desempenho de dois métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da infecção: microimunofluorescência (MIF) e ELISA. Investigamos também uma associação entre a presença da bactéria e a asma em sessenta voluntários entre 4 e 15 anos de idade, 30 asmáticos e 30 não asmáticos. 8,3%, 10% e 5% entre os asmáticos tiveram resultados positivos para IgA, IgG e IgM respectivamente. 3,4%, 10% e 1,7% foram positivos para estes anticorpos entre os não asmáticos. No teste de ELISA, 11,7% foram positivos para IgG, ($p > 0,05$). 5% foram positivos para IgM, todos do sexo masculino e pertencentes ao grupo de asmáticos ($p = 0,2373$). Houve concordância nos resultados dos dois métodos de 93,3% e 88,3% para pesquisa de IgG e IgM, respectivamente. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e positivo do teste de ELISA para a pesquisa de IgG em comparação com a MIF foram 66,7; 98; 94,3 e 85,7%, respectivamente. Da mesma forma, os resultados para IgM foram 50, 98, 96,2 e 66,7%, respectivamente. Observou-se maior prevalência da presença de anticorpos entre os jovens com idade superior a 10 anos ($p = 0,0729$). Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0287$) foi observada entre indivíduos asmáticos em uso de corticosteróides e aqueles que não utilizam a medicação. Evidência sorológica da presença de infecção pela bactéria foi

maior nos indivíduos em uso da medicação, indicando que o uso desses medicamentos pode predispor os pacientes à infecção. A utilização de dois métodos para a detecção de anticorpos *anti-C. pneumoniae* permitiu verificar que os pacientes em uso de corticosteróides são mais suscetíveis a esta infecção na população avaliada, entretanto MIF se mostrou mais adequado para esta finalidade. É necessária a continuidade do estudo, com maior número de pacientes para avaliação mais precisa da associação entre a asma e a infecção por *Chlamydomphila pneumoniae*.

Palavras-chave: *Chlamydomphila pneumoniae*, asma.

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways associated with environmental factors, genetic, immunological, occupational, infectious, among others, which may contribute to the onset of disease, and for exacerbation of their symptoms. Respiratory infections play an important role in promoting tissue damage observed in asthma. *Chlamydia pneumoniae* is an obligate intracellular bacterium associated with respiratory tract infections. Transmitted person - to person contact through respiratory secretions has been associated with several chronic respiratory conditions, including asthma. In this work we evaluated the frequency of specific anti - *C. pneumoniae* between asthmatics and non asthmatics and compared the performance of two serological tests used in diagnosis of infection: microimmunofluorescence (MIF) and ELISA. We also investigate an association between the presence of bacteria and asthma in sixty volunteers between 4 and 15 years old, 30 asthmatic and 30 non-asthmatics. 8.3%, 5 % and 10% among asthmatic patients were positive for IgA, IgG and IgM respectively. 3.4 %, 10 % and 1.7 % were positive for these antibodies among non-asthmatics. In the ELISA test, 11.7% were positive for IgG ($p > 0.05$). 5 % were positive for IgM, all male and belonging to the group of asthmatics ($p = 0.2373$). There was agreement in the results of the two methods was 93.3 % and to 88.3 % for IgG and IgM, respectively. Sensitivity, specificity, negative predictive value and positive ELISA test for the detection of IgG compared with MIF were 66.7, 98, 94.3 and 85.7 %, respectively. Similarly, the results for IgM were 50, 98, 96.2 and 66.7 %, respectively. There was a higher prevalence of antibodies among young people aged over 10 years ($p = 0.0729$). Statistically significant difference ($p = 0.0287$) was observed between asthmatic subjects using corticosteroids and those who did not use medication. Serological evidence of the presence of infection by the bacteria was higher among those taking the drug, indicating that these drugs may predispose patients to infection. The use of two methods to detect anti - *C.pneumoniae* has shown that patients on corticosteroids are more susceptible to this infection in this population; however MIF was more appropriate for this purpose. It is necessary to continue the study with a larger number of patients for

more accurate assessment of the association between asthma and *Chlamydophila pneumoniae*.

Keywords : *Chlamydophila pneumoniae*, asthma

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias são definidas como aquelas que acometem o trato e os órgãos do sistema respiratório, de natureza infecciosa ou não, sendo divididas em doenças agudas e crônicas. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que as doenças respiratórias representam a principal causa de morte e incapacidade em todos os grupos de idade em todo o mundo. Quase um quinto de todas as mortes é atribuído às desordens respiratórias, o que torna essas condições um grave problema de saúde pública.

Entre as desordens respiratórias, as infecções agudas acometem parcela importante da população, mas principalmente crianças e idosos. A OMS estima que 20% de todas as mortes em crianças abaixo de 5 anos de idade sejam consequência de infecção aguda do trato respiratório, sendo que 90% dessas mortes devem-se a pneumonias.

Além das infecções agudas, as doenças respiratórias crônicas (DRC) também atingem um grande número de pessoas em todo mundo. A maior parte das DRC é representada por asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), rinite alérgica, doenças pulmonares ocupacionais e hipertensão pulmonar. Atualmente, cerca de 380 milhões de pessoas são afetadas por doenças respiratórias crônicas (DRC) em todo o mundo. No Brasil, dados do 33º Congresso Brasileiro de Pediatria realizado em Recife em 2006, apontam para um número de 40 milhões de pessoas acometidas por DRC.

Dentre as DRC a asma é a mais prevalente, atingindo mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, 15 milhões só no Brasil, sendo a principal doença crônica entre as crianças. Registros recentes mostram que no ano 2000, o número de mortes no país tendo a asma como causa primária, chegou a 4900 pessoas. E em 2002 representou a terceira causa mais importante de internações no sistema único de saúde (SUS). Só em 2005 aproximadamente 255 mil pessoas morreram em todo o mundo em consequência da doença e estima-se que este número possa aumentar em 20% nos próximos 10 anos, tornando-se um grande desafio para os serviços de saúde pública.

A asma é uma desordem inflamatória crônica das vias aéreas, na qual diversos fatores genéticos, ambientais, alérgicos, infecciosos, ocupacionais,

emocionais e nutricionais contribuem para a expressão do fenótipo. É caracterizada por produção aumentada de muco e hipersensibilidade das vias aéreas, resultando em diminuição do fluxo de ar e marcada por episódios recorrentes de chiados, tosse e respiração curta. Em consequência destes sintomas, a maioria dos indivíduos experimenta absenteísmo elevado tanto na escola como no trabalho, além de prejuízo da qualidade de vida decorrente de distúrbios do sono, dificuldade de atenção e concentração e perda de memória.

O aumento mundial na incidência de asma e o impacto da doença nos serviços de saúde pública têm levado a novas pesquisas que investigam a etiologia da doença. Existem evidências de que as infecções do trato respiratório podem atuar como um gatilho para o início ou exacerbação da asma e, neste sentido, o papel desempenhado pelas infecções virais já está bem estabelecido. Trabalhos mais recentes apontam também para o envolvimento das bactérias, entre elas, *Chlamydophila pneumoniae*. A bactéria tem sido associada à exacerbação, gravidade e aumento da incidência de condições pulmonares crônicas, incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica e asma brônquica em adultos. Entretanto, o papel das infecções bacterianas nestes processos ainda não está claro.

Especificamente em crianças, diferentes autores que pesquisam a associação de *C. pneumoniae* com doenças do trato respiratório, têm encontrado taxas de infecção que variam de 0 a 44%, dependendo da população estudada e dos métodos utilizados no estudo. Há evidências de que a exposição prévia à *C. pneumoniae* e/ou a infecção persistente estejam relacionadas com a gravidade da asma, conforme estudos realizados utilizando ferramentas moleculares ou marcadores sorológicos para avaliar a infecção pela bactéria.

O diagnóstico da infecção ainda representa um desafio. As ferramentas baseadas em técnicas moleculares, apesar das altas especificidade e sensibilidade, não são capazes de determinar uma infecção ativa. Por outro lado, métodos sorológicos permitem, na sua maioria, apenas um diagnóstico retrospectivo, sendo mais úteis em estudos epidemiológicos. Já o cultivo celular,

considerado o padrão ouro para estabelecer a viabilidade e infectividade do micro-organismo, apresenta baixa sensibilidade, além de se caracterizar como um método bastante complexo, demorado e de alto custo.

Diante da falta de dados brasileiros em relação à ocorrência desta bactéria na população, especialmente em crianças com asma estável e as dificuldades em seu diagnóstico, este trabalho pretendeu avaliar a frequência desta infecção entre tais indivíduos e um grupo controle, bem como avaliar os métodos utilizados em seu diagnóstico, na tentativa de estabelecer uma correlação entre a presença da bactéria e a asma, em pacientes atendidos no ambulatório de pneumologia pediátrica São Vicente do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2. Revisão da Literatura

2.1 Classificação Taxonômica de *Chlamydiaceae*

Os membros da ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, são parasitas intracelulares obrigatórios de células eucarióticas, capazes de causar doenças em homens e animais. São bactérias Gram negativas, cocóides e imóveis, que possuem um ciclo evolutivo bifásico, se multiplicam por divisão binária e são inteiramente dependentes da célula hospedeira para o suprimento de ATP e outras moléculas ricas em energia. São capazes de sintetizar suas próprias proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, tendo sido observada ainda a existência de parede celular, DNA, RNA e ribossomos procariotos, o que permitiu sua classificação entre as bactérias (EVERETT, 1999; MURRAY, 2004, HAMMERSCHLAG, 2007). Sua parede celular é composta por lipídeos, aminoácidos, além de lipopolissacarídeos na membrana externa. Devido a sua dependência da maquinaria biossintética da célula hospedeira, a família *Chlamydiaceae* foi originalmente incluída entre os vírus.

Conhecida desde 1907, somente em 1966 a família *Chlamydiaceae* foi definitivamente classificada entre as bactérias, com o gênero *Chlamydia* sendo estabelecido. Por muitos anos, pela ausência de testes ou dados genéticos, *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia psittaci*, a primeira associada ao tracoma e ao linfogranuloma venéreo e a segunda à psitacose, foram as duas únicas espécies reconhecidas em *Chlamydiaceae*, a única família da ordem *Chlamydiales*. A partir de 1989, com o advento de técnicas de hibridação DNA-DNA, foi proposta a criação de duas novas espécies: *Chlamydia pneumoniae*, isolada de seres humanos e *Chlamydia pecorum*, contendo linhagens isoladas de bovinos e ovinos (HOGAN, 2004; BUDAI, 2007).

Uma análise taxonômica recente, baseada em critérios fenotípicos e na sequência de nucleotídeos dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, permitiu separar a ordem *Chlamydiales* em quatro famílias distintas, cinco gêneros e 12 espécies (**Tabela 1**) – (EVERETT, 1999).

Tabela 1 - Resumo da classificação taxonômica proposta para a ordem *Chlamydiales* (BUDAI, 2007; PALDANIUS, 2007). A nova classificação foi proposta por EVERETT et al, 1999.

Família	Gênero	Espécies
Chlamydiaceae	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia muridarum</i>
		<i>Chlamydia suis</i>
		<i>Chlamydia trachomatis</i>
	<i>Chlamydophila</i>	<i>Chlamydophila abortus</i>
		<i>Chlamydophila caviae</i>
		<i>Chlamydophila felis</i>
		<i>Chlamydophila pecorum</i>
		<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
		<i>Chlamydophila psittaci</i>
	<i>Simkania</i>	<i>Simkania negensis</i>
Simkaniaceae		
<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydia</i>	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>
<i>Waddliaceae</i>	<i>Waddlia</i>	<i>Waddlia chondrophila</i>

2.2 Ciclo de vida e características da família *Chlamydiaceae*

O complexo ciclo de replicação intracelular das clamídias é único entre as bactérias e comum a todos os membros da ordem *Chlamydiales*. Seu ciclo de desenvolvimento apresenta duas formas morfolologicamente distintas: uma menor e extracelular denominada corpúsculo elementar (CE) e uma maior, intracelular denominada corpúsculo reticular (CR) (HAHN, 1999, VARSAT et al, 2005). Medindo entre 0,2 e 0,6 µm de diâmetro, o CE é a forma infecciosa, responsável pelo ataque e entrada do micro-organismo na célula hospedeira. Possui parede rígida, resultado de várias ligações dissulfeto em sua superfície, conferindo resistência a várias condições ambientais inóspitas. As clamídias estão entre os poucos procariotos que não possuem parede celular composta por peptidoglicano, muito embora análises genômicas recentes tenham revelado que ambas *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*, apresentam genes que codificam componentes deste, incluindo proteínas ligantes da penicilina (BEATY, 1994;

HAMMERSCHLAG, 2002). Os CRs são maiores, medindo entre 800 e 1000 µm de diâmetro e, ao contrário dos CEs, não são capazes de sobreviver fora das células hospedeiras e se constituem na forma replicativa do micro-organismo. São metabolicamente ativos e sintetizam DNA, RNA e proteínas (BEATY, 1994; PEELING & BRUNHAM, 1996; HAMMERSCHLAG, 2002; VARSAT *et al*, 2005).

Todas as clamídias codificam uma proteína denominada MOMP (do inglês *major outer membrane protein*) ou OmpA exposta na superfície da célula (HAMMERSCHLAG, 2002; BUDAI, 2007). Além da MOMP, duas outras proteínas ricas em cisteína estão presentes na superfície da bactéria: proteína A do complexo de membrana externa (OmcA) e a proteína B do complexo de membrana externa da bactéria (OmcB). Juntas, as três proteínas formam o complexo de membrana externa de clamídia (COMC) (KNUDSEN, 1999). As clamídias também apresentam um determinante antigênico lipopolissacarídeo (LPS) comum a todas as espécies da família, e que também pode apresentar reação cruzada com o LPS de outras bactérias Gram negativas (KNUDSEN, 1999). O tamanho do genoma da família *Chlamydiaceae* varia de 1,0 a 1,24 Mbp, com um conteúdo de citosina e guanina de aproximadamente 40% e informação suficiente para codificar aproximadamente 600 proteínas (EVERETT, 1999).

A infecção se inicia quando o CE infeccioso ataca a célula alvo por uma ligação eletrostática e penetra na célula por endocitose (LANE *et al*, 2008) (**Figura 2**). O mecanismo preciso pelo qual os CEs entram na célula ainda não está totalmente esclarecido. Trabalhos recentes sugerem que as clamídias empregam uma molécula de sulfato de heparan que se assemelha aos receptores de glicosaminoglicanos (GAG) na superfície da célula eucariótica. Há ainda a suspeita de que a proteína de choque térmico de 70 Kd (Heat shock protein 70) possa mediar a entrada da bactéria, aumentando sua adesão à célula hospedeira (PEELING & BRUNHAM, 1996; CAMPBELL & KUO, 2004; YAN, 2005). Como outros micro-organismos, as clamídiaceas também possuem os genes necessários para reunir o aparato do sistema de secreção tipo III (T3SSs). Em *C. pneumoniae*, CpMip uma suposta proteína secretada por este sistema, mostrou-se essencial no estabelecimento da infecção (HERRMAN, 2006). A **Figura 1** mostra

como ocorrem as várias interações entre a bactéria e a célula hospedeira no momento do ataque até a interiorização bacteriana (VARSAT *et al*, 2005)

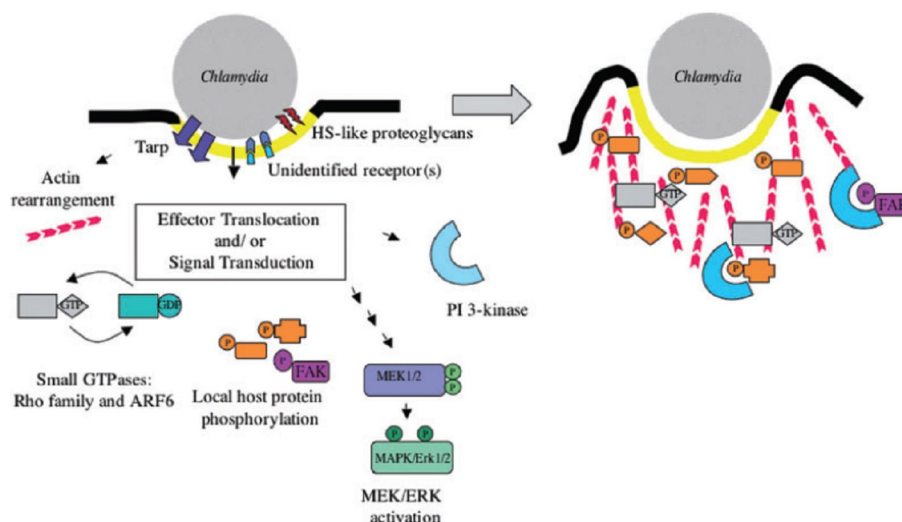


Figura 1 – Mecanismo proposto para o ataque e entrada de *Chlamydia* nas células epiteliais (VARSAT *et al*, 2005; SWANSON *et al*, 2007). Muitas espécies ou linhagens clamidiais interagem com a célula hospedeira através de uma interação eletrostática reversível de sulfato heparan semelhante aos receptores de glicosaminoglicanos presentes na superfície das células epiteliais. Acredita-se que esta interação é acompanhada por outra irreversível com receptores celulares ainda desconhecidos possivelmente localizados em domínios da membrana ricos em colesterol. Após a ligação, vias sinalizadoras específicas da célula hospedeira são acionadas, levando à internalização da bactéria. Moléculas efetoras secretadas por um mecanismo semelhante ao sistema de secreção tipo III contribuem neste processo. Tarp é secretado no ponto de contato dos CEs com a célula hospedeira e expostos na face citoplasmática da membrana onde está associado ao recrutamento de actina. Pequenas GTPases que controlam a própria polimerização da actina, são também necessárias neste processo de entrada da bactéria. Muitas vias de sinalização são ativadas durante a entrada clamidial, embora haja distinções entre as espécies e a generalizações neste sentido são difíceis. Rac 1 e Cdc42 são ambas ativadas após a infecção por *C. Caviae* GPIC, mas Rho parece não ter participação neste processo. Rac1, mas não Cdc42, é ativado na entrada de *C. trachomatis*. A pequena GTPase ARF6 também controla a reorganização da actina no local de entrada de *C. caviae* GPIC. A infecção leva a rápida fosforilação de proteínas da célula hospedeira que se acumulam no local de entrada da bactéria. Em particular, *C. pneumoniae* e *C. caviae* GPIC ativam pelo menos duas vias de sinalização distintas envolvendo PI 3-kinase e MEK e ERK kinases. PI 3-kinase não é necessária pra a entrada de *C. trachomatis* sorovar L2. Um dos primeiros substratos identificado a sofrer fosforilação durante a infecção por *C.*

Pneumoniae é o FAK que interage com a subunidade reguladora p85 de PI 3-kinase. Em poucos minutos após o ataque bacteriano a polimerização de actina é iniciada (painel à direita).

A internalização é um passo crítico no ciclo patogênico das clamídias. Dentro da célula, os CEs permanecem circundados pela membrana do fagossoma, formando um vacúolo que não se funde ao lisossomo celular, denominado vacúolo de inclusão. No interior do fagossoma, os CEs se diferenciam em CRs metabolicamente ativos, que se multiplicam por divisão binária nas primeiras 24 horas. Subseqüentemente, os CRs sofrem condensação e se diferenciam em novos CEs infecciosos nas 24 horas seguintes. Apesar do acúmulo de 500 a 1000 novos CEs dentro do vacúolo de inclusão, a célula hospedeira não se rompe. Em aproximadamente 48 a 72 horas, os novos CEs são liberados da célula hospedeira por citólise, por um processo de exocitose ou por extrusão total da inclusão, o que deixa a célula intacta (**Figura 1**). Esta última estratégia capacita o micro-organismo a passar despercebido pelo sistema imune do hospedeiro, favorecendo a instalação de infecção crônica (HAMMERSCHLAG, 2002; MUKHOPADHYAY, 2006).

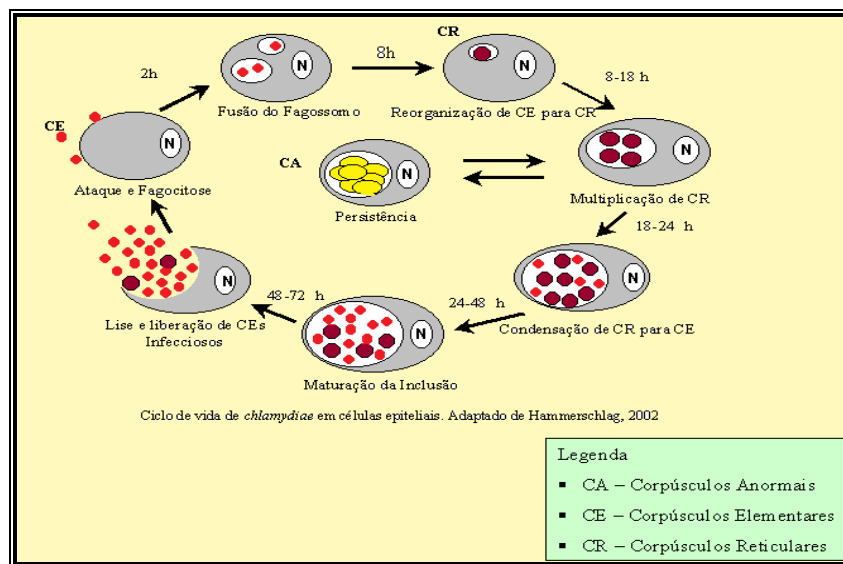


Figura 2: Ciclo de desenvolvimento de Chlamydiaceae (HAMMERSCHLAG, 2002). A infecção se inicia quando um corpo elementar (CE) se aproxima e penetra na célula hospedeira por endocitose. Em seguida os CEs se diferenciam em corpos reticulares (CR), multiplicando-se dentro do fagossoma. Posteriormente os CRs diferenciam-se em novos CEs e são liberados pela célula por lise ou extrusão para iniciar novo ciclo. Ao centro da figura observam-se corpúsculos anormais (CA) responsáveis por infecções persistentes.

Sob condições ainda não muito claras, clamídias podem ocorrer como formas anormais ou aberrantes que são caracterizadas por mudanças na morfologia ultraestrutural e perfil de expressão gênica, por exemplo OmpA e OmpB ou proteínas de inclusão de membrana, além de expressão aumentada de genes necessários à replicação de DNA. Existem evidências de que IFN γ , terapia antimicrobiana inadequada, uso contínuo de corticóides inalados, depleção de certos nutrientes ou outras condições como tabagismo, idade avançada e hereditariedade possam ser fatores que estimulem a persistência da infecção (LAITINEN, 1996; AIRENNE, 1999; von HERTZEN, 2002; HOOGAN, 2004; KERN, MAASS & MAASS, 2009).

2.3 *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae é um importante patógeno do trato respiratório e amplamente distribuído pelo mundo. Foi isolado pela primeira vez em secreção ocular de uma criança em Taiwan em 1965 durante uma triagem para vacina antitracoma, quando foi, então, denominado TW-183 (KUO, 1995; CAMPBELL, 1998). Em 1968, outro isolado muito semelhante foi obtido de uma secreção ocular no Irã e denominado IOL-207. Somente em 1983 o micro-organismo foi associado à doença respiratória quando foi isolado da faringe de um estudante em Seattle, Estados Unidos, recebendo o código AR-39. Estudos posteriores comprovaram que TW-183 e AR-39 se tratavam do mesmo organismo, então denominado TWAR (KUO, 1995; PALDANIUS, 2007). Inicialmente considerada uma linhagem da *Chlamydia psittaci*, em 1986 a TWAR foi definitivamente caracterizada como patógeno do trato respiratório humano e em 1989 foi descrita como a terceira espécie do gênero *Chlamydia*, recebendo o nome de *Chlamydia pneumoniae* (KUO, 1995; BLASI, 2004). Desde então, apenas um sorotipo havia sido descrito para a bactéria (WANG, 2000). Com a revisão taxonômica e criação do gênero *Chlamydophila*, *Chlamydia pneumoniae* passou a ser denominada *Chlamydophila pneumoniae* (EVERETT, 1999; MARTÍNEZ TAGLE, 2001). A atual classificação taxonômica divide *C. pneumoniae* em três biovariantes distintas:

humana, (TWAR), Koala e equina. Esta distinção foi possível pela análise comparativa da sequência dos genes (L. POSPSIL & J. CANDLERLE, 2004; HAMMERSCHLAG, 2007).

Nas infecções por *C. pneumoniae*, as inclusões não possuem glicogênio e seus corpúsculos elementares apresentam forma piriforme circundada por um espaço periplasmático morfológicamente distintos dos corpúsculos elementares de *C. trachomatis* e *C. psittaci*. *C. pneumoniae* também não possui plasmídios. Diferentes isolados de *C. pneumoniae* têm entre 94 a 100% de homologia no DNA (KUO, 1995; EVERETT, 1999).

C. pneumoniae tem emergido como um dos principais patógenos respiratórios intracelulares não virais e está associada a uma grande variedade de doenças agudas e crônicas, entre elas: otite média, pneumonia adquirida na comunidade (PAC), faringite, sinusite, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença cardíaca coronariana, aterosclerose, asma, esclerose múltipla e Alzheimer (GAYDOS, 1996; MIYASHITA, 2002; RONCHETTI, 2005; NORMANN, 2006).

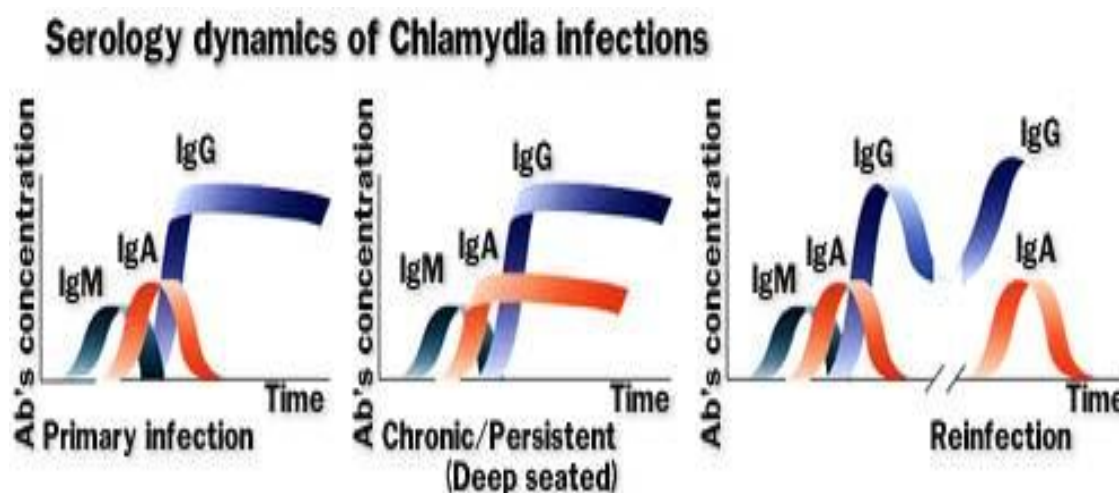
2.4 Manifestações Clínicas

C. pneumoniae é apontada como responsável por aproximadamente 10% das pneumonias e 5% das bronquites e sinusites. Não há um conjunto único de sinais e sintomas para a infecção pulmonar pelo micro-organismo, o que pode prejudicar a determinação de sua verdadeira etiologia, uma vez que outros micro-organismos também provocam sinais e sintomas semelhantes (CUNHA, 2006; HAHN, 2006; KERN, MAASS & MAASS, 2009).

A doença respiratória, muitas vezes, tem início subagudo, acompanhado de faringite e rouquidão, dor de cabeça, dispnéia, mialgia, sintomas que podem desaparecer espontaneamente antes da completa instalação da doença. Enquanto a tosse aparece como sintoma comum e pode permanecer por semanas a meses, a febre, muitas vezes, está ausente (KUO, 1995; KUO, 1999; PRINCIPI, 2001; ESPOSITO, 2006; CHEDID, 2007; OKTEM, 2007 JUVONEN, 2008). Em

crianças, as pneumonias são indistinguíveis daquelas causadas por outros patógenos (WOLF, 2007).

Os achados laboratoriais são inespecíficos. A contagem de leucócitos pode estar aumentada, podendo alcançar valores maiores que 20.000 células /mm³, com um leve desvio à esquerda, mas normalmente não ultrapassa 15.000 células/mm³. A velocidade de hemossedimentação (VHS) também pode se elevar. Radiografias do tórax revelam pneumonite segmental que varia de branda, em pacientes ambulatoriais, até comprometimento bilateral com derrame pleural nos casos mais graves de pacientes internados. É comum um curso mais grave da doença em adultos mais velhos que, muitas vezes, associada a uma outra doença de base, pode ser fatal (KUO, 1995; HAMMERSCHLAG, 2000; PULJIZ, 2005; OKTEM, 2008; PAPAETIS, 2008). Na infecção primária aguda, a resposta de anticorpos não ocorre prontamente. Wang (2000) acompanhou a cinética dos anticorpos IgG e IgM durante o curso de uma infecção aguda pelo micro-organismo (**Fig. 3**). Ele observou aumento gradual de IgM, com pico de concentração por volta do 40º dia após a infecção, acompanhado por diminuição gradual até seu total desaparecimento em torno do 100º dia. Os anticorpos IgG



aumentam sua

Figura 3 - Cinética dos anticorpos IgA, IgG e IgM na infecção aguda por *C. pneumoniae* (WANG, 2000). Na infecção primária (gráfico 1), observa-se o aparecimento de anticorpos IgM, acompanhado de aparecimento e aumento gradual de anticorpos IgA e IgG. Na infecção

persistente (gráfico 2), observa-se concentração persistentemente aumentada de anticorpos IgA e IgG. Na reinfecção (gráfico 3), observa-se aumento na concentração de IgA e IgG sem aparecimento de IgM.

concentração lentamente, atingindo um máximo em aproximadamente 50 dias, permanecendo elevado por meses. Na infecção persistente/crônica observa-se uma concentração persistente de IgA e IgG. Já nas reinfecções observa-se um rápido aumento de IgG e IgA, sendo que o segundo retorna ao padrão basal também rapidamente (WANG, 2000; HAMMERSCHLAG, 2002).

Há também evidências do envolvimento de *C. pneumoniae* na formação de placas ateromatosas em artérias coronárias. Estudos sugerem que *C. pneumoniae* possa infectar e reproduzir-se em células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos humanos e que essas células infectadas sejam o veículo de disseminação da bactéria para outros locais no corpo. Há evidências de que a infecção persistente das artérias coronárias por este micro-organismo possa contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose. Fatores de virulência ainda desconhecidos ou moléculas de adesão podem contribuir para a infecção coronariana (GAYDOS, 1996; LAITINEN, 1996; HEINEMANN, 1996; AIRENNE, 1999; CAMPBELL & KUO, 2004; PAPAETIS, 2008).

2.5 Diagnóstico das Infecções por *Chlamydomphila pneumoniae*

2.5.1 Cultivo celular

O cultivo e isolamento de *C. pneumoniae* é altamente específico, sendo considerado o padrão ouro para estabelecer a viabilidade e infectividade do micro-organismo nos espécimes clínicos coletados. No entanto, apresenta baixa sensibilidade, resultando em altos índices de resultados falso-negativos (BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002; LITTMAN, 2005; GOURIET, 2008). Cultivar o micro-organismo é uma tarefa bastante complexa, exige muito tempo, além de ter um alto custo, o que normalmente inviabiliza seu uso rotineiro em laboratórios clínicos, tornando-o uma atividade quase que exclusiva de laboratórios de pesquisa (DOWELL, 2001; PALDANIUS, 2007; MIYASHITA, 2008).

C. pneumoniae cresce pouco em cultura e forma inclusões menores que aquelas observadas para outras *Chlamydiaceae*. As melhores linhagens de células para o seu cultivo são HL e Hep-2 (KUO, 1995; GAYDOS, 1996; HAMMERSCHLAG, 2000; L. POSPSIL & J. CANDLERLE, 2004). Uma ampla variedade de espécimes clínicos pode ser utilizada para o cultivo do micro-organismo. Estudos sugerem que, em crianças, o melhor local para coleta de amostra é a nasofaringe (HEINEMANN, 1996; LAITINEN, 1996; AIRENNE, 1999; BOMAN, 1999; HAMMERSCHLAG, 2000).

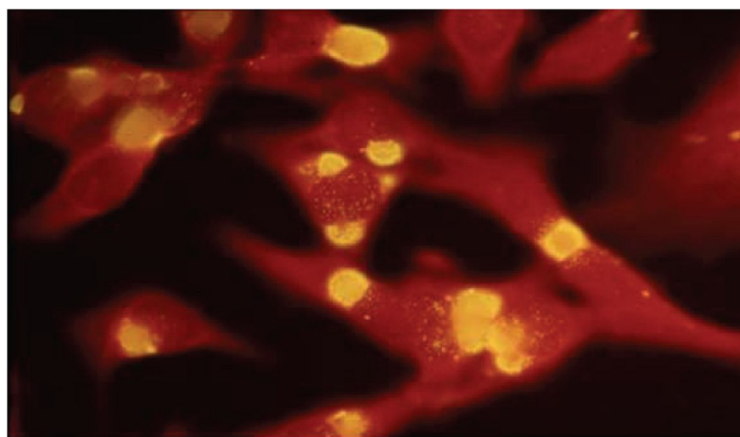


Figura 4 - Célula hospedeira linhagem (BV-2) infectada por *C. pneumoniae* após 72 horas (PALDANIUS, 2007). No interior das células observam-se inclusões citoplasmáticas coradas por fluorocromo, examinadas ao microscópio de fluorescência.

A especificidade da cultura depende da habilidade do analista em distinguir as verdadeiras inclusões dos artefatos em exame microscópico da monocamada de células após coloração com anticorpo fluorescente, tarefa que deve ser executada por pessoas bem treinadas e experientes (DOWELL, 2001; PALDANIUS, 2007; MIYASHITA, 2008).

2.5.2 Detecção de Antígeno

A detecção de antígenos de *C. pneumoniae* tornou-se possível após a produção de anticorpos monoclonais específicos em laboratório, que tem sido muito útil na detecção do micro-organismo em cultura de células.

Entre os vários métodos usados na detecção de antígeno, o DFA (Direct Fluorescence Antibody), fluorescência direta com anticorpo, é o mais utilizado. Por este método, anticorpos monoclonais ligados a um fluorocromo ligam-se diretamente ao antígeno existente na amostra clínica. Esfregaços feitos a partir de swabs de garganta, nasofaringe, lavado bronco alveolar ou aspirados são fixados em lâmina de vidro com acetona e processados até a fase em que são cobertos por uma solução contendo os anticorpos monoclonais ligados ao fluorocromo (KUO, 1995; PEELING & BRUNHAM, 1996). A sensibilidade do teste DFA está estimada em 20 a 60% comparada com a cultura, dependendo do local de origem da amostra clínica (PALDANIUS, 2007; MIYASHITA, 2008).

Outros testes para detecção de antígenos têm sido desenvolvidos por vários fabricantes. Entre eles está a detecção direta de LPS e imuno complexos com o uso de ensaio imunoenzimático (EIE) (PAPAETIS, 2008; MIYASHITA, 2008).

2.5.3 Detecção de Anticorpos

2.5.3.1 Fixação do Complemento

Embora exista uma ampla variedade de métodos sorológicos para o diagnóstico da infecção por *C. pneumoniae*, até o momento, nenhum exhibe um desempenho totalmente satisfatório e a escolha do método sorológico pode ter importantes implicações no diagnóstico da infecção (SCHUMACHER, 2001; HOYMANS, 2003). Todos se baseiam na pesquisa qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa de anticorpos específicos ou não contra o micro-organismo. Fatores como a falta de reagentes de alta qualidade, alta prevalência de anticorpos em certas populações de adultos, dificuldade de obtenção de amostras adequadamente pareadas e a curta duração da proteção por anticorpos (3 a 5 anos) são apontados como causas para a difícil padronização desses métodos (BENNEDSEN, 2002; JOHNSTON & MARTIN, 2005).

Desde 1930, a fixação do complemento (FC) tem sido usada para o diagnóstico de infecção clamidial, tais como psitacose e linfogranuloma venéreo. A

técnica é baseada na reatividade do antígeno gênero específico LPS (lipopolissacarídeo) encontrado na superfície da bactéria. Apesar de permitir a detecção de infecção aguda por *C. pneumoniae*, pois os anticorpos gênero específicos contra LPS aparecem mais rapidamente na corrente sanguínea, a FC apresenta baixas sensibilidade e especificidade, especialmente nas reinfecções, podendo ocorrer reações cruzadas com outras clamídias e outras bactérias Gram negativas. Além disso, este teste não permite identificar as diferentes classes de anticorpos (PEELING, 2000; PERSSON & BOMAN, 2000; WANG, 2000).

2.5.3.2 Ensaios Imunoenzimáticos

Vários testes de EIE e suas modificações estão disponíveis comercialmente para a detecção de anticorpos contra *C. pneumoniae* e sua utilização é muito promissora. Embora sejam mais fáceis de padronizar, até o momento, nenhum foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos. Diferentes antígenos têm sido usados para a preparação dos ensaios, desde o LPS até proteínas recombinantes, algumas sendo capazes de distinguir entre os diferentes anticorpos. As vantagens desta técnica incluem alto rendimento, acessibilidade técnica, automação, um ponto final bem definido e rapidez de execução. No entanto, ainda apresentam problemas com sensibilidade e especificidade (OSTERGAARD & MOLLER, 1995; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002; CORSARO & GREUB, 2006; MIYASHITA, 2006). Os testes baseados em EIE também mostram reatividade cruzada com outras espécies de clamídia apesar das tentativas de se bloquear ou remover os epitopos gênero específicos (PORTIG, 2003; MIYASHITA, 2008). Isso tem levado ao questionamento de qual seria o melhor antígeno a ser utilizado nos testes de EIE. Um antígeno ideal seria aquele reconhecido em todos os pacientes infectados por uma espécie em particular, não sendo reconhecido pela resposta imune a outras clamídias (PORTIG, 2003). Miyashita e colegas, 2008, conduziram um experimento baseado na detecção de anticorpos IgM por imunocromatografia. Esta pode ser uma ferramenta bastante útil na detecção rápida de anticorpos, tornando possível um diagnóstico mais precoce da infecção aguda por *C. pneumoniae*.

2.5.3.3 Microimunofluorescência

A microimunofluorescência (MIF) foi desenvolvida inicialmente por Wang e Grayston para o diagnóstico e sorotipagem de infecção por *C. trachomatis* no início da década de 1970. Subsequentemente, a técnica foi adaptada para detecção de anticorpos anti *C. pneumoniae*. Nesta técnica, corpúsculos elementares (CE) purificados fixados em lâmina de vidro são usados para detectar anticorpos específicos IgA, IgG e IgM presentes no soro do paciente. Após incubação, a preparação é recoberta e incubada com um fluorocromo ligado a uma antiglobulina humana (conjugado) e examinada ao microscópio de fluorescência. A visualização de CEs fluorescentes aleatoriamente distribuídos (**figura 5**) é considerada uma reação positiva (CAMPBELL, 1998; WANG, 2000; MIYASHITA, 2008).

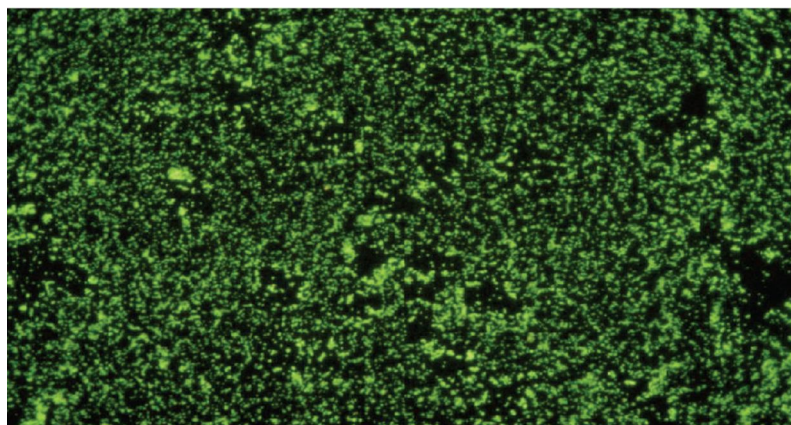


Figura 5 - Reação positiva para *C. pneumoniae* em MIF. Observam-se corpúsculos elementares purificados verde-brilhantes distribuídos aleatoriamente sobre a lâmina (PALDANIUS, 2007).

Atualmente, a MIF é considerada o método sorológico de escolha para o diagnóstico de infecção causada por essa bactéria pela sua alta sensibilidade e especificidade (DOWELL, 2001; PAPAETIS, 2008). Títulos de IgM $\geq 1/16$ ou IgG $\geq 1/512$ em amostra única, ou aumento de 4 vezes nos títulos de IgG em amostras pareadas são sugestivos de infecção aguda. O diagnóstico de infecção aguda por *C. pneumoniae* baseado apenas em uma dosagem aumentada de IgG, mas abaixo de 1/512 deve ser tomado com muita cautela, pois especialmente em

peessoas mais idosas tem sido observado IgG com títulos persistentemente elevados. Títulos de IgG $\geq 1/16$ até $1/512$ sugerem infecção passada ou preexistente. Recentemente tem sido proposto o uso de IgA como marcador de infecção crônica. A vida média de IgA é curta, 5 a 6 dias e níveis persistentemente elevados podem sugerir cronicidade, mas ainda não há consenso neste aspecto (WANG, 2000; DOWELL, 2001; PAPAETIS, 2008). Um bom diagnóstico baseado em sorologia só é possível ao se examinar amostras pareadas coletadas com intervalos de 4 a 8 semanas após o início dos sintomas (WANG, 2000; DOWELL, 2001; PRINCIPI & ESPOSITO, 2001).

Na infecção primária, anticorpos IgM podem levar até seis semanas para aparecerem na corrente sanguínea e anticorpos IgG até 8 semanas. A ausência de IgM por várias semanas após a infecção não exclui o diagnóstico de infecção aguda. Nas reinfecções, IgG aumenta rapidamente em uma ou duas semanas, enquanto pode não ocorrer mudança na concentração de IgM (PRINCIPI & ESPOSITO, 2001; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002; LITTMAN, 2005).

Reações cruzadas têm sido relatadas, já que antígenos comuns a outras clamídias estão presentes na superfície dos CEs utilizados na MIF. No entanto, em um relato recente não se observou reação cruzada com outras famílias da ordem *Chlamydiales*, exceto com *Parachlamydia acanthamoebae* (PERSSON & BOMAN, 2000; HOYMANS, 2003; CASSON, 2006). Outra dificuldade é a ausência de anticorpos em pessoas com cultura positiva confirmada. Essa condição é rara em adultos, mas pode ocorrer em crianças, especialmente naquelas abaixo de 10 anos de idade. A falta de reatividade do soro desses pacientes pode ser secundária à falta de reatividade do organismo à MOMP de *C. pneumoniae* (PRINCIPI & ESPOSITO, 2001; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002). Apesar dos problemas apontados a MIF ainda é considerada o método de escolha para o diagnóstico de infecção inclusive na fase aguda (PAPAETIS, 2008; MIYASHITA, 2008).

A interpretação das reações em MIF também apresenta dificuldades. Por se tratar de uma técnica não automatizada, somente profissionais bem treinados e

experientes devem proceder à sua execução devido ao seu alto grau de subjetividade. Este tem sido apontado como um dos motivos para as variações nos resultados observadas entre diferentes laboratórios, além da qualidade dos conjugados, temperatura e tempo de incubação, entre outros (PEELING, 2000; WANG, 2000; BENNEDSEN, 2002; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002; JOHNSTON & MARTIN, 2005). A presença de fator reumatóide (FR) também pode causar resultados falsamente positivos, especialmente nas análises de amostras de pessoas mais idosas, já que este tem a tendência de aumentar com a idade. Recomenda-se o uso de adsorventes de FR nas pesquisas de IgM e IgA (KUO, 1995; WANG, 2000; DOWELL, 2001; PALDANIUS, 2007).

2.5.4 Métodos moleculares para detecção de *C. pneumoniae*

Um dos maiores desafios no manejo de pacientes com infecção do trato respiratório é a rápida identificação do agente etiológico. Neste aspecto, as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos trouxeram grande avanço. Técnicas como a PCR (Polymerase Chain Reaction) oferecem a possibilidade de se detectar e amplificar rapidamente pequenas quantidades de DNA ou RNA presentes nas amostras biológicas, o que torna essas técnicas importantes ferramentas diagnósticas (RAMIREZ, 1996; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002; MIYASHITA, 2008).

Em infecções por *C. pneumoniae*, vários tipos de amostras biológicas têm sido usados para a detecção da bactéria. Swabs nasais, da orofaringe ou da nasofaringe, escarro, lavado bronco alveolar, líquido aspirado de ouvido e células mononucleares do sangue periférico têm sido as amostras mais comumente usadas na pesquisa da bactéria para diagnóstico das infecções das vias aéreas (KUO, 1995; BOMAN, 1999; DOWELL, 2001; MIYASHITA, 2007). Em crianças, amostras coletadas da nasofaringe possibilitam uma melhor detecção e recuperação de ácidos nucléicos da bactéria quando comparada com swabs de garganta (BOMAN, 1999; HAMMERSCHLAG, 2000). As amostras devem ser colhidas com o auxílio de um swab com extremidade tipo Dacron (uma espécie de

fibra ou tecido sintético de poliéster) com cabo de plástico. Swabs com extremidade contendo alginato de cálcio ou algodão comum e cabo de madeira ou alumínio podem conter inibidores da PCR (BOMAN, 1999; DOWELL, 2001). Após a coleta, as amostras devem ser colocadas em meio de transporte 2SP (sacarose 2 fosfato) e transportadas ao laboratório em temperatura até 4°C. As amostras não processadas em 24 horas devem ser armazenadas em freezer em temperatura de -70°C. Para pesquisas de mRNA, as amostras devem ser armazenadas em freezer a -70°C imediatamente para evitar degradação do mesmo (BOMAN, 1999; DOWELL, 2001).

Além da rapidez e da possibilidade de detectar inclusive micro-organismos não viáveis em uma variedade de amostras biológicas, cada tipo de PCR empregado oferece vantagens e desvantagens que devem ser levadas em conta no momento da escolha e execução. Apenas 4 protocolos para PCR são recomendados pelo FDA por atender aos critérios de validação previamente estabelecidos (BOMAN, 1999; DOWELL, 2001; BOMAN & HAMMERSCHLAG, 2002).

Tabela 2. Comparação entre métodos diagnósticos para *C. pneumoniae*. (PALDANIUS, 2007)

Método	Deteção	Sensibilidade	Especificidade	Interpretação
DFA	Antígeno	20% - 60%	70% - 95%	Subjetiva
Cultura	Micro-organismo	50% - 75%	100%	Subjetiva
PCR	Acido nucléico	10 – 100	95% - 100%	Objetiva
Sorologia	Anticorpos	60% - 80%	90% - 100%	Subjetiva/Objetiva

2.6 Epidemiologia

A grande maioria dos estudos epidemiológicos sobre infecções por *C. pneumoniae* deriva de avaliações sorológicas, caracterizadas pela pesquisa de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA encontradas na resposta humoral diante da infecção, utilizando microimunofluorescência. Os dados apontam para uma distribuição mundial do micro-organismo, com uma soroprevalência maior que

50% em pessoas adultas nos Estados Unidos (CAMPBELL, 1998; HAMMERSCHLAG, 2000; JOHNSTON & MARTIN, 2005).

Dados de 1995 apontavam que, só nos Estados Unidos, 300 mil novos casos de infecção por *C. pneumoniae* eram registrados a cada ano (KUO, 1995). Levantamentos sorológicos demonstram um aumento na prevalência de anticorpos contra o micro-organismo com o aumento da idade, sendo 10% dos 5 aos 10 anos de idade, atingindo 30 a 45% na adolescência e, muitas vezes, excedendo 80% em pessoas idosas (HAMMERSCHLAG, 2000). Outros afirmam que 64% das crianças em idade escolar terão pelo menos um episódio de infecção pela bactéria nos seus primeiros oito anos de vida (TEIG, 2005). Estes resultados são compatíveis com os achados de Grayston (1992), nos quais se observa uma baixa prevalência em crianças abaixo de cinco anos de idade. É comum uma maior prevalência entre homens adultos que em mulheres (HAMMERSCHLAG, 2000). A proporção de infecção do trato respiratório inferior em crianças e adultos incluindo pneumonia adquirida na comunidade (PAC) associada a *C. pneumoniae* em estudos publicados nos últimos 6 anos variou de zero a 44,2% (HAMMERSCHLAG, 2007; WOLF, 2007). Na Finlândia, mais de 50% dos casos de infecção primária pela bactéria ocorrem no período de inverno (JUVONEN, 2008).

Em um estudo realizado no Brasil sobre infecção respiratória causada por *C. pneumoniae* em adultos não asmáticos, Chedid e colaboradores (2007) encontraram uma soroprevalência de 63,8%, resultado compatível com os observados por pesquisadores em outros países. Este estudo mostrou uma incidência de 5,2% de PAC causada por *C. pneumoniae*, provavelmente subestimada, já que não foi possível realizar o cultivo celular da bactéria nem a sua detecção utilizando ferramentas de biologia molecular. Neste estudo, os autores recomendam o uso de testes moleculares e destacam sua utilidade. Outro trabalho pioneiro no Brasil demonstrou uma frequência de 35% de positividade em amostras de soro coletadas entre tribos indígenas na região amazônica (ISHAK & ISHAK, 2001).

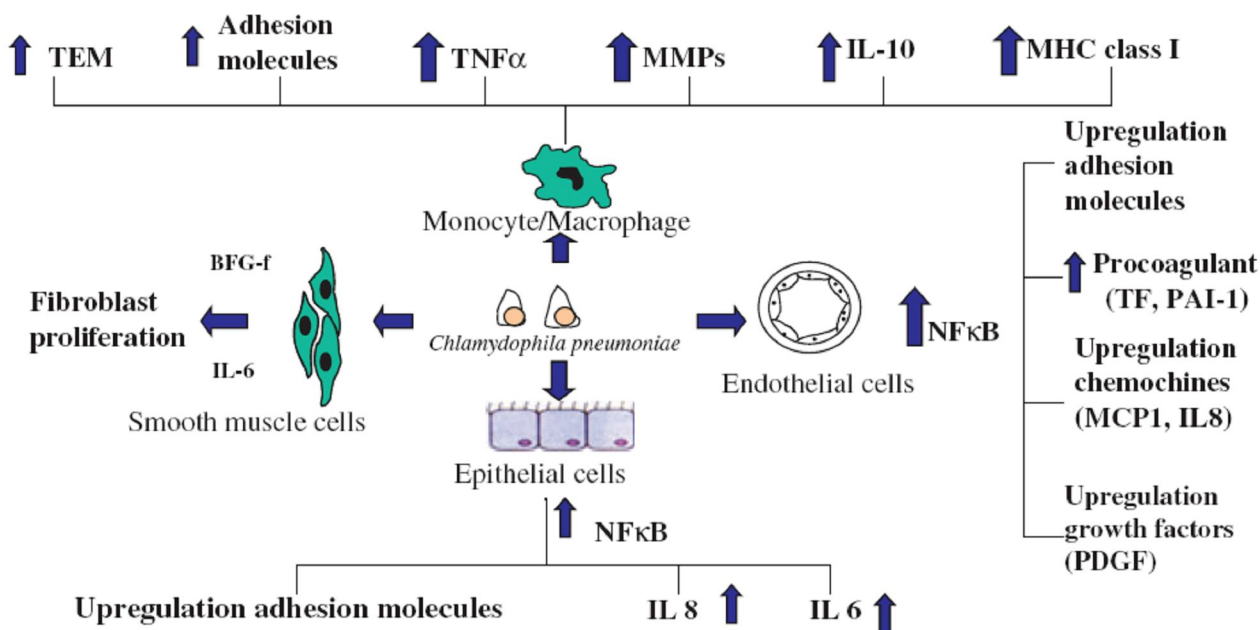
A transmissão ocorre pelo contato pessoa-pessoa via secreções respiratórias, via fômites ou pelo contato com portadores assintomáticos. A bactéria pode sobreviver em aerossol à temperatura ambiente e condições de alta umidade relativa (HAMMERSCHLAG, 2000). Considerando a exposição quase universal de seres humanos à bactéria e o modo de transmissão relativamente ineficiente, tem sido levantada uma hipótese de uma fonte ambiental próxima aos humanos (HAMMERSCHLAG, 2007). A infecção primária ocorre mais freqüentemente dos 5 aos 15 anos de idade, sendo mais comum dos 5 aos 9, com período de incubação de aproximadamente 21 dias. A resposta de anticorpos à infecção normalmente é limitada por 3 a 5 anos (KUO, 1999; CORREIA, 2005; DAL MOLIN, 2005; JUVONEN, 2008). De uma maneira geral, estima-se que muitas pessoas terão duas ou três infecções por *C. pneumoniae* ao longo da vida (PASTERNAK, 2005).

2.7 *Chlamydophila pneumoniae* e Asma

Como doença inflamatória crônica das vias aéreas, a asma se caracteriza por diminuição do fluxo de ar, marcado por episódios recorrentes de chiado, tosse e respiração ofegante influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro (MÜLLER, 2001; KING, 2004; SUTHERLAND, 2007).

A associação entre infecção do trato respiratório e exacerbação aguda da asma há muito tempo é reconhecida (ALLEGRA, 1994). Em 1932 Cooke cunhou o termo “asma infecciosa” para os casos de asma precipitados ou sustentados por infecção (BLACK, 2007). Há evidências de uma associação entre infecções do trato respiratório causadas por bactérias “atípicas” com a diminuição do fluxo do volume expiratório (FEV₁), aumento da hipersensibilidade e início dos sintomas de asma em indivíduos não asmáticos (MACDOWELL & BACHARIER, 2005). A presença prolongada de certos micro-organismos nos brônquios pode estar associada ao desenvolvimento da asma e, *Chlamydophila pneumoniae*, pela sua habilidade em causar infecções persistentes e escapar da atuação do sistema imune humano, pode está envolvida (HAMMERSCHLAG, 2002, von HERTZEN, 2002; OKTEM, 2007). A interação entre a bactéria e o epitélio brônquico resulta

em uma cascata de liberação de citocinas e moléculas de adesão, responsáveis pelo quadro inflamatório e sintomatologia apresentada pelo paciente. A **Figura 6** resume esta interação da bactéria com os vários elementos celulares envolvidos.



TEM = transendotelial migration, MMPs = Matrix metalloproteinases; NF = Nuclear factor; MCP = Monocyte chemotactic protein; BFG = Basic Fibroblast growth factor, TF = Tissue Factor, PAI 1 = Plasminogen activator inhibitor1

Figura 6 – Interação de *C. pneumoniae* com diversos tipos celulares humanos. BFG = Fator de crescimento básico do fibroblasto; IL = Interleucinas; MCP = Proteína quimiotática do monócito; MHC = Principal complexo de histocompatibilidade; MMP = Matriz de metaloproteínas; NF κ B = Fator nuclear kappa B; PAI-I = Ativador-inibidor – I de plasminogênio; PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas; TEM = Migração transendotelial; TF = Fator tecidual; TNF α = Fator de necrose tumoral α . **Blasi, et al, 2009.**

Hahn e colaboradores em 1991 foram os primeiros a observar uma associação entre a infecção por *C. pneumoniae* e a asma, quando descreveram quatro casos onde os indivíduos desenvolveram asma após infecção do trato respiratório por este micro-organismo (BLACK, 2000). Em um segundo estudo do mesmo autor, 11% das culturas para *C. pneumoniae* foram positivas em indivíduos asmáticos e apenas em 5% nos indivíduos controles. Há também relatos de que pacientes tratados com terapia anti-clamidal melhoraram em seus sintomas de asma, mas não está claro se a erradicação do micro-organismo foi a responsável pela melhora clínica (CUNNINGHAM, 1998). Apesar das evidências,

ainda não há consenso sobre o envolvimento de *C. pneumoniae* na patogênese da doença e as conclusões são ainda controversas.

A maioria dos estudos que estabeleceu uma associação entre a bactéria e a asma foi conduzida em pacientes adultos. Informações em crianças são escassas, embora muitos relatem uma associação entre exacerbação aguda da asma e infecção pela bactéria. Nestes estudos a proporção de identificação de *C. pneumoniae* em crianças asmáticas tem variado de 4,5 a 25%, dependendo do método utilizado e da população avaliada (BLASI & JOHNSON, 2007; WAZIR, 2007; NAGY, 2007).

Os níveis de anticorpos IgM, IgG e IgA são frequentemente avaliados para a investigação de uma associação entre a asma e a infecção por *C. pneumoniae*. Diferentes estudos, sempre avaliando crianças asmáticas e não asmáticas, mostram níveis elevados dos três anticorpos contra a bactéria em crianças asmáticas quando comparadas a não asmáticas (DAL MOLIN, 2005; RONCHETTI, 2005; ANNAGÜR, 2007). Esta relação positiva entre a asma e a infecção por *C. pneumoniae* foi também encontrada em estudos utilizando lavado broncoalveolar coletado de crianças asmáticas e posteriormente analisados por PCR (BISCIONE, 2004; RONCHETTI, 2005; WEBLEY, 2005), e cultura para *C. pneumoniae* (WEBLEY, 2005). Em conjunto, os estudos vem mostrando uma forte associação da infecção e a asma nos indivíduos IgG e PCR positivos.

Alguns autores sugerem então que a bactéria possa ter um papel nas exacerbações agudas da asma (ANNAGÜR, 2007). A presença da bactéria aliado à existência de uma resposta imune deficiente pode dificultar a eliminação do micro-organismo após uma infecção inicial, o que favorece o estado de portador do micro-organismo encontrado na nasofaringe destes indivíduos (RONCHETTI, 2005).

Por outro lado, Larsen e colaboradores (1998) não encontraram qualquer relação entre a pesquisa de IgG e IgE contra *C. pneumoniae* e asma. Outros estudos também não demonstraram nenhuma relação entre a infecção por *C. pneumoniae* e início de asma aguda, mas uma possível associação entre asma

crônica grave e infecção por *C. pneumoniae* foi observada (COOK, 1998; CUNNINGHAM, 1998). Com base nos resultados de microimunofluorescência para detecção de anticorpos IgA e IgG contra a bactéria, Mills e colaboradores (2000) concluíram que a infecção por esta bactéria não representa um fator de risco importante para o desenvolvimento de asma em crianças e adultos jovens, não descartando, porém, o possível papel do micro-organismo em outros grupos de asmáticos.

Embora existam evidências, ainda não há consenso sobre o envolvimento de *C. pneumoniae* na patogênese da doença e as conclusões são ainda controversas. Por outro lado, apesar de sua ubiquidade, *C. pneumoniae* é raramente pesquisada ou diagnosticada como causadora de infecção na prática clínica devido à carência de testes rápidos, sensíveis e específicos para a sua detecção.

3. JUSTIFICATIVA

A associação de *C. pneumoniae* a diferentes quadros clínicos já está bem descrita, não se sabendo ainda a sua real participação no desencadeamento dos mesmos. Além disso, existem muitos relatos de infecções assintomáticas sem que se saiba o real papel desta bactéria em doenças crônicas do trato respiratório, como a asma.

Enquanto a exata contribuição das infecções por patógenos atípicos na patogênese e fenótipo da asma ainda permanece indeterminada, uma grande quantidade de pesquisas básica e clínica têm surgido implicando estes microrganismos como fatores potencialmente importantes nos quadros de asma.

Uma vez que ainda pouco se conhece sobre condições para o desenvolvimento ou para o controle da asma, bem como sobre o papel de agentes etiológicos infecciosos em sua gênese ou sua exacerbação, acreditamos ser, assim, relevante uma investigação sobre a relação entre a infecção por *C. pneumoniae* e a asma. Determinar um componente infeccioso no processo asmático trará importante informação, uma vez que pode auxiliar na condução de uma intervenção terapêutica adequada, contribuindo assim para o controle da doença e para a diminuição dos impactos individuais, econômicos e sociais causados pela asma.

Por outro lado, os dados sobre a prevalência desta infecção no Brasil são ainda muito escassos e não permitem estabelecer uma relação entre asma e infecção por *C. pneumoniae* seja em população adulta ou infantil.

Desta forma, acreditamos que este estudo possa contribuir não só para o esclarecimento sobre a existência ou não de uma relação entre a asma e a infecção por *C. pneumoniae* como para o conhecimento da prevalência desta infecção em crianças de nossa região, asmáticas e não asmáticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de anticorpos IgG, IgA e IgM contra *Chlamydophila pneumoniae* em crianças e adolescentes asmáticos e não asmáticos entre 4 a 15 anos de idade.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Investigar a ocorrência de anticorpos específicos IgG, IgA, e IgM contra *C. pneumoniae* em crianças asmáticas e indivíduos controle pelo método de microimunofluorescência e IgG e IgM pelo método de Elisa.
- 4.2.2 Comparar o desempenho dos dois para o diagnóstico da infecção por *C. pneumoniae* na população avaliada.
- 4.2.3 Investigar uma possível relação entre a presença da bactéria e a asma.

5. Materiais e Métodos

5.1 População estudada

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais (**Anexo 3**).

Foram avaliadas amostras de 60 pacientes pediátricos com idade entre 4 e 15 anos. 30 pacientes asmáticos foram atendidos no Ambulatório São Vicente de Pneumologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal Minas Gerais (UFMG). O diagnóstico de asma nestes pacientes foi feito a partir de consultas com o médico pneumologista, de acordo com os critérios estabelecidos pelo GINA (Global Initiative for Asthma). Outros 30 pacientes não asmáticos foram escolhidos entre aqueles que procuraram atendimento médico para outros fins, dos quais nenhum apresentava problemas respiratórios. As consultas e coletas se deram entre os meses de março e agosto de 2008. Os responsáveis pelas crianças foram esclarecidos sobre a pesquisa e, após assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**), foram submetidos a um questionário (**Anexo 2**). Mesmo com autorização dos pais ou responsáveis, todas as crianças foram consultadas a respeito da sua participação no estudo. Só então as crianças foram encaminhadas para a coleta da amostra clínica. Todos os pacientes foram divididos em grupos conforme a idade. Grupo 1, entre 4 e 6 anos, pré escolar, grupo 2, entre 7 e 10 anos, escolar e grupo 3, adolescentes entre 11 e 15 anos.

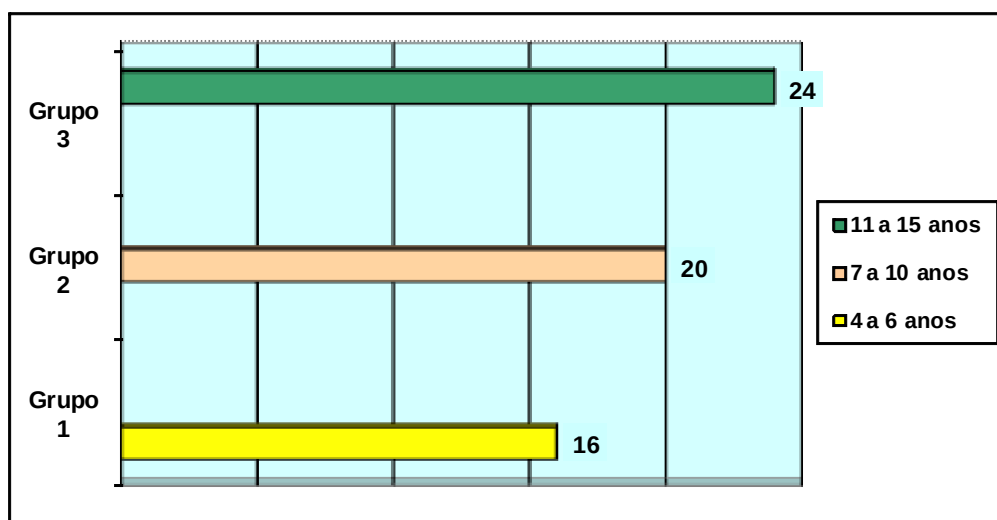


Figura 7 – Distribuição de pacientes conforme grupos de idades.

A participação não foi remunerada e não houve nenhuma desistência durante o desenvolvimento da pesquisa. Até o momento da coleta das amostras apenas um paciente apresentou sinais e sintomas compatíveis com infecção aguda por *Chlamydophila pneumoniae* como tosse, coriza, dor de cabeça.

5.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios para pacientes asmáticos e não asmáticos

- ❖ Crianças com idade entre 4 e 15 anos com diagnóstico de asma crônica estável (pacientes asmáticos).
- ❖ Crianças com idade entre 4 e 15 anos sem diagnóstico de qualquer doença respiratória (pacientes não asmáticos).
- ❖ Não portadoras de doenças genéticas.
- ❖ Não portadores de imunossupressão, neoplasias ou doenças hematológicas.
- ❖ Crianças eutróficas.
- ❖ Crianças as quais os responsáveis permitiram a sua participação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.2 Coleta da amostra clínica

Amostras de sangue total de pacientes e indivíduos controle foram coletadas para proceder à detecção de anticorpos específicos IgA, IgG e IgM contra *C. pneumoniae*. Foram coletados 3,0 mL de sangue total, usando agulhas para coleta à vácuo (**Vacurette**) 25x8 mm em tubo sem anticoagulante (**Vacurette**). Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas (**centrífuga Sigma®, 6-15**) por 5 minutos a 3000 g. Este procedimento foi realizado nas primeiras seis horas após a coleta. O soro foi separado, aliquotado em microtubos e estocado a -20°C até o procedimento dos testes de microimunofluorescência e Elisa (WANG, 2000; ANNAGÜR, 2007, MIYASHITA, 2008).

5.3 Sorodiagnóstico da infecção por *C. pneumoniae*.

5.3.1 Microimunofluorescência

A pesquisa de anticorpos foi feita com o uso de kits reagentes comerciais SeroFIA-*Chlamydia* gentilmente cedidos pela Savyon® Diagnostics Ltd., Israel. Foram pesquisados os anticorpos específicos IgA, IgG e IgM. Cada lâmina possui 7 conjuntos de 3 círculos contendo corpos elementares purificados de *C. pneumoniae* (TW183), *C. trachomatis* (L2) e *C. psittaci* (SZ-1) respectivamente. (Figura 8).

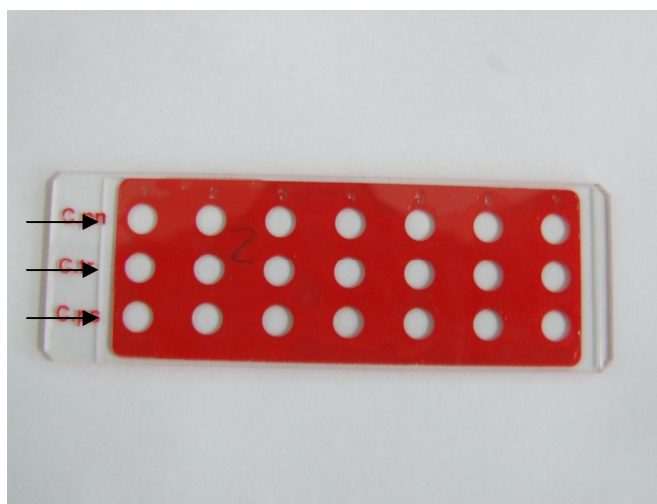


Figura 8- Lâminas de vidro contendo antígenos de *C. pneumoniae* (TW 183), *C. trachomatis* (L2) e *C. psittaci* (SZ-1) indicados pelas setas. A amostra diluída e soros controles são adicionados em cada poço de reação e a lâmina incubada. Após lavagem, adiciona-se um conjugado (antiglobulina humana ligado a um fluorocromo) e a lâmina novamente incubado e lavada. Em seguida, adiciona-se um fluido de montagem, cobrindo-a com lamínula. Posteriormente a lâmina é analisada em microscópio com lâmpada fluorescente em aumento de 100x sob imersão. A reação é considerada positiva quando são observados corpúsculos elementares verde brilhantes aleatoriamente distribuídos.

5.3.1.1 Pesquisa de anticorpos IgM – Para a pesquisa de IgM anti *C. pneumoniae*, as amostras de soro foram primeiramente tratadas com solução adsorvente para inativação de IgG e fator reumatóide, homogeneizadas em vórtex e finalmente diluídas a uma proporção de 1/20. Posteriormente, as amostras

diluídas e soros controles positivo e negativo foram depositados em cada um dos três círculos disponíveis para a reação e incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com tampão PBS-Tween fornecido pelo próprio fabricante, conforme orientação do fabricante. Após secagem das mesmas, um conjugado contendo fluoresceína ligada a uma antiglobulina humana foi adicionado a cada local de reação e as lâminas incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas e secas ao ar livre. Após lavagem e secagem, cada lâmina recebeu duas gotas do líquido de montagem e foram recobertas por lamínula. Após estes procedimentos cada lâmina foi examinada em microscópio com lâmpada fluorescente em aumento de 100x sob imersão (**Jenamed 2, Zeiss**). A observação de corpúsculos elementares aleatoriamente distribuídos, verde brilhantes, indicou reação positiva.

Nas infecções agudas por *C. pneumoniae*, os anticorpos IgM podem ser detectados por volta da segunda e terceira semanas após o início dos sintomas. Neste trabalho, títulos superiores a 1/20 foram considerados positivos, conforme manual de operações do fabricante do teste.

5.3.1.2 Pesquisa de anticorpos IgA e IgG – Para a pesquisa de IgA e IgG cada amostra foi diluída a uma proporção de 1/32 e 1/64, respectivamente conforme orientação do fabricante. Após adição das amostras diluídas e soro controles em cada local de reação, as lâminas foram incubadas a 37°C por minutos. Decorrido o tempo, as lâminas foram lavadas com tampão PBS-Tween, secas ao ar livre e em seguida, um conjugado contendo fluoresceína ligada a uma antiimunoglobulina humana foi adicionado a cada local de reação e as lâminas incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Após lavagem e secagem, cada lâmina recebeu duas gotas do líquido de montagem e foram recobertas por lamínula. Após estes procedimentos cada lâmina foi examinada em microscópio com lâmpada fluorescente em aumento de 100 X sob imersão (**Jenamed 2, Zeiss**). A observação de corpúsculos elementares verde brilhantes, aleatoriamente distribuídos, indicou reação positiva.

A sorologia para IgG contra *C. pneumoniae* por microimunofluorescência é muito útil no sorodiagnóstico da infecção pela bactéria. O encontro de títulos superiores a 1/512 em amostra única ou o aumento de quatro vezes nos títulos em duas amostras consecutivas são sugestivos de infecção aguda. O encontro de títulos abaixo de 1/512 é sugestivo de infecção passada.

5.3.2 Pesquisa de anticorpos por Elisa

Assim como na microimunofluorescência, a pesquisa de anticorpos por ELISA permite a determinação dos diferentes tipos de anticorpos específicos contra *C. pneumoniae*. Os anticorpos presentes na amostra sorológica são capturados pelos antígenos previamente fixados na fase sólida (placa de Elisa). Após incubação e lavagem para a retirada de componentes não ligados, um conjugado contendo uma enzima peroxidase e uma antiglobulina humana é adicionada à reação e a placa é novamente incubada e lavada. A adição de tetrametilbenzidina como substrato e posteriormente uma solução ácida conferem à reação uma coloração amarelada. A intensidade da cor é proporcional à concentração de anticorpos presentes na amostra. Neste trabalho procedeu-se somente a pesquisa de anticorpos IgG e IgM contra *C. pneumoniae*.

Foi empregado um *kit* comercial NovaLisa™ (Novatec Immunodiagnostica GMBH, Alemanha). Trata-se de um ensaio imunoenzimático qualitativo para a determinação de anticorpos específicos IgG e IgM contra *C. pneumoniae* baseado na técnica de Elisa (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Antígenos de *C. pneumoniae* previamente fixados em poços de reação em placa ligam-se aos anticorpos específicos presentes em amostras devidamente diluídas após incubação (**Figura 9**). Após lavagem em lavadora de placas de Elisa (**Termo Plate Washer**) para a remoção de material não ligado, um conjugado contendo a enzima peroxidase ligada a uma antiimunoglobulina humana foi adicionado à preparação que foi novamente incubada. Este conjugado liga-se aos anticorpos anti *C. pneumoniae* capturados na etapa anterior. Posteriormente, a placa foi novamente lavada. O imunocomplexo formado foi visualizado pela adição de um

substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB), que confere uma coloração azul à reação. Uma solução de ácido sulfúrico foi adicionada à preparação para parar a reação, conferindo uma coloração amarela à preparação. A intensidade de cor do produto formado é proporcional à concentração de anticorpos presentes no soro. Posteriormente, a placa foi lida em leitor de placas de Elisa (**Termo Plate Reader**) em 450 nm. Os resultados foram visualizados após impressão (**Termo Plate, Printer**).

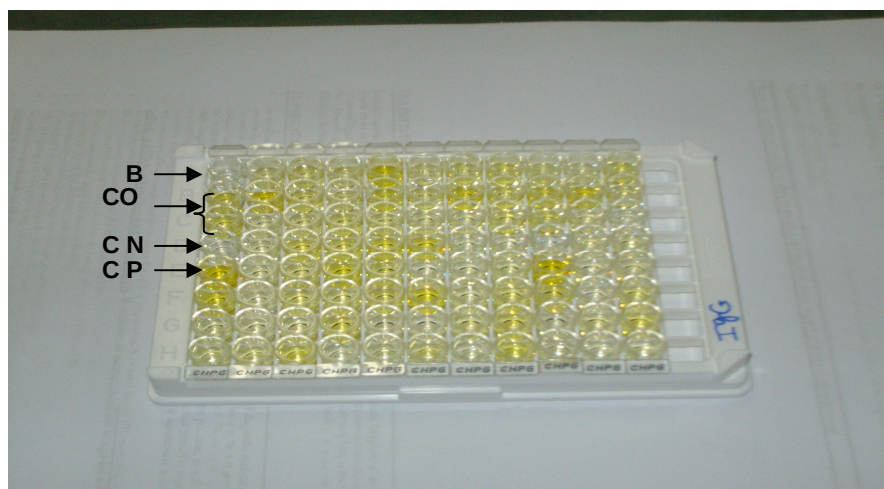


Figura 9 – Reação de ELISA para pesquisa de anticorpos contra *C. pneumoniae*. Placa de Elisa após reação. A intensidade da cor é proporcional à concentração de anticorpos na amostra. As setas indicam a posição em que foram pipetados: B = Branco; CO = Cut-off (feito em duplicata); CN = Controle Negativo; CP = Controle Positivo.

Para a validação do ensaio para avaliação dos dois anticorpos, a medida da absorbância dos controles positivo e negativo e o *cut-off* (ponto de corte) deveriam apresentar valores previamente estabelecidos pelo fabricante. O *cut-off* para os dois anticorpos foi realizado em duplicata. **Branco: < 0,100; controle negativo: < 0,200; cut-off: entre 0,250 e 0,900; controle positivo: ≥ ao valor do cut-off.** Todos os resultados obtidos nos ensaios realizados atenderam aos critérios acima citados (dados não mostrados).

Para o cálculo dos resultados foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Cálculo do cut-off} - \text{Cut-off} = \frac{\text{Abs 1} + \text{Abs 2}}{2}$$

2

Para avaliação dos dois anticorpos, uma amostra foi considerada positiva quando o valor de sua absorbância medida a 450nm atingiu valor 10% maior que o valor do *cut-off*. Valores 10% abaixo do *cut-off* foram considerados negativos, conforme instruções do fabricante. Amostras que apresentaram absorbância entre 10% acima e 10% abaixo do *cut-off* foram consideradas indeterminadas, conforme instruções do fabricante.

O cálculo dos resultados e sua expressão em unidades NovaTec (forma de expressão dos resultados em unidades do próprio fabricante) foi também realizado para os dois anticorpos. Os parâmetros para a definição de resultados positivos e negativos são observados abaixo:

$$\text{Cálculo em Unidades NovaTec (UNT)} - \frac{\text{Abs amostra} \times 10}{\text{Média Abs Cut-off}}$$

Para a avaliação de anticorpos IgG e IgM *anti-C. pneumoniae*, os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os seguintes critérios:

Negativo	-	< 9 UNT
Positivo	-	> 11 UNT
Indeterminado	-	Entre 9 e 11 UNT

5.3.3 Determinação da sensibilidade e especificidade

Segundo Fletcher et al (1991), a **Sensibilidade** de um teste é a capacidade em reconhecer os indivíduos verdadeiramente positivos em relação ao total de doentes. Assim, a sensibilidade avalia a capacidade do teste de detectar a doença quando ela realmente está presente. **Especificidade** é o poder que o teste possui de distinguir os verdadeiros negativos em relação ao total de doentes, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a hipótese da doença quando ela está realmente ausente(Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação da validade de um teste diagnóstico

Resultado do Teste	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro Positivo (A)	Falso Positivo (B)
Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro Negativo (D)

De acordo com o quadro acima, temos que, algebricamente:

Sensibilidade: $A/A+C$

Especificidade: $D/B+D$

Valor preditivo positivo (VPP): é a probabilidade de um caso identificado com um determinado teste ser de fato positivo. O Valor Preditivo Positivo (VPP) expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença.

Algebricamente temos: $VPP = A / A + B$

Valor preditivo negativo (VPN): é a probabilidade de um resultado negativo obtido por um determinado teste ser de fato negativo, ou seja, o Valor Preditivo Negativo (VPN) expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença.

Algebricamente temos: $VPN = D / C + D$

5.4 Análise Estatística dos dados

Os dados compilados dos questionários preenchidos pelos participantes foram analisados pelo programa EpiInfo, versão 3.4.3. Os dados obtidos sobre a presença da infecção pelas técnicas sorológicas, juntamente com os dados clínicos dos envolvidos no estudo, foram analisados estatisticamente utilizando-se o Teste Qui – Quadrado, Teste Exato de Fischer, considerando-se as diferenças significativas quando $p < 0,05$ e o coeficiente de correlação Kappa.

6. Resultados

6.1 Caracterização da população estudada.

A **Figura 10** mostra que a maior parte das amostras (29) dos pacientes controles foi coletada entre os meses de março e abril e apenas uma amostra destes pacientes foi coletada no mês de agosto, completando o nº total de 30 amostras. Isso se explica pelo fato de ter havido neste período maior disponibilidade de tempo do profissional para a seleção dos pacientes. No grupo de pacientes asmáticos houve uma distribuição mais homogênea durante o período de coleta das amostras, sendo o mês de março o período de maior nº de amostras coletadas (9). Em julho apenas uma amostra foi coletada para este grupo.

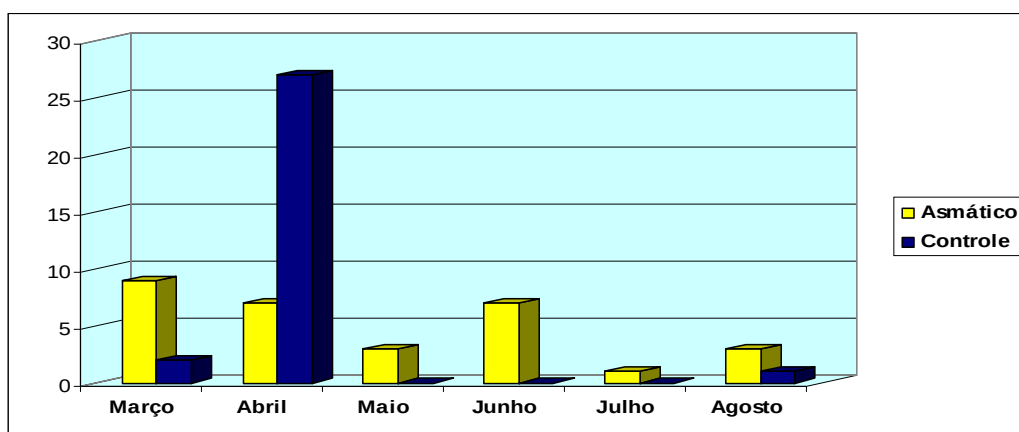


Figura 10 – Nº de pessoas asmáticas e não asmáticas (controle) que participaram da pesquisa no período de março a agosto de 2008.

A avaliação dos pacientes quanto à localização de sua residência mostrou que 35% (21 indivíduos) dos participantes residiam em Belo Horizonte, enquanto que os demais 65% (39 indivíduos) residiam no interior ou região metropolitana de Belo Horizonte. Entre os indivíduos asmáticos 46,7% (14 indivíduos) declararam residir em Belo Horizonte e 53,3% (16 indivíduos) no interior ou região metropolitana. Entre os pacientes controle 76,7% (23 indivíduos) declararam residir no interior ou região metropolitana e 23,3% (7 indivíduos) declararam residir em Belo Horizonte (**Figura 11**). Não houve diferença estaticamente significativa entre os pacientes asmáticos e não asmáticos quanto ao local de residência ($p=0,1043$).

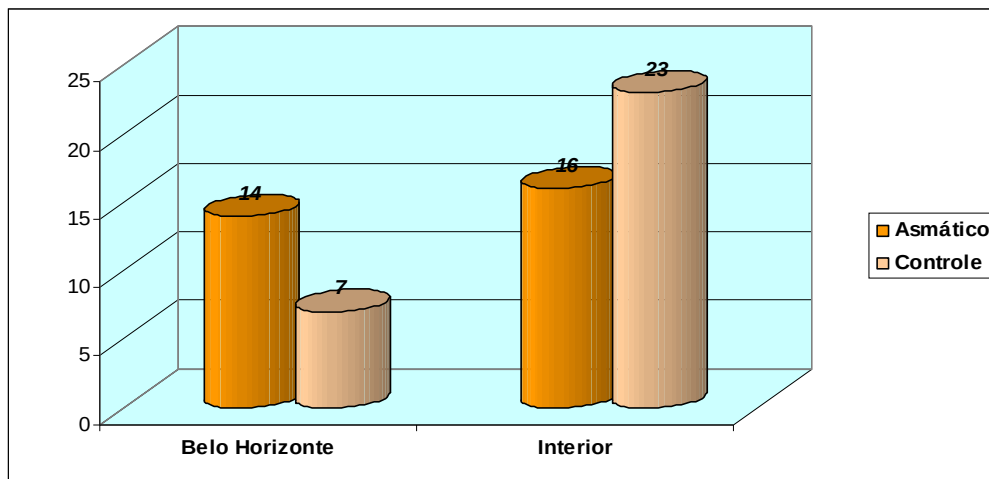


Figura 11 – Distribuição de pacientes asmáticos e controle de acordo com localização da moradia. $p= 0,1043$.

Na avaliação socioeconômica dos participantes 52 informaram renda familiar de até 3 salários mínimos e meio, 3 com renda familiar de 4 a 5,5 salários mínimos e apenas 2 participantes com renda familiar de 6 salários mínimos. Um número de 3 participantes não informaram a renda familiar. A média da renda familiar entre os participantes da pesquisa esteve em 2,12 salários mínimos (dados não mostrados)

Também foi avaliado o número de cômodos da residência de cada participante e a média obtida foi de 5,6 cômodos por residência. Outro item avaliado foi o número de pessoas ocupando o mesmo quarto. A média obtida para este parâmetro foi de 2,4 pessoas, variando de 1 a 8 pessoas no mesmo quarto, sendo que três indivíduos não informaram quantas pessoas dividiam o mesmo quarto (dados não mostrados).

6.2 Pesquisa sorológica da infecção por *C. pneumoniae*

6.2.1 Pesquisa de anticorpos *anti-C. pneumoniae* utilizando a técnica de microimunofluorescência.

6.2.1.1 Pesquisa de IgA *anti-C. pneumoniae* –

Das 60 amostras analisadas, 7 (11,67%) foram positivas para IgA, sendo cinco portadores de asma crônica (8,3%) e dois (3,37%) pertencentes ao grupo controle (**Figura 12a**), $p = 0,4238$. Dos indivíduos com resultado positivo, quatro eram do sexo masculino e três do sexo feminino (**Figura 12b**), $p = 1,000$.

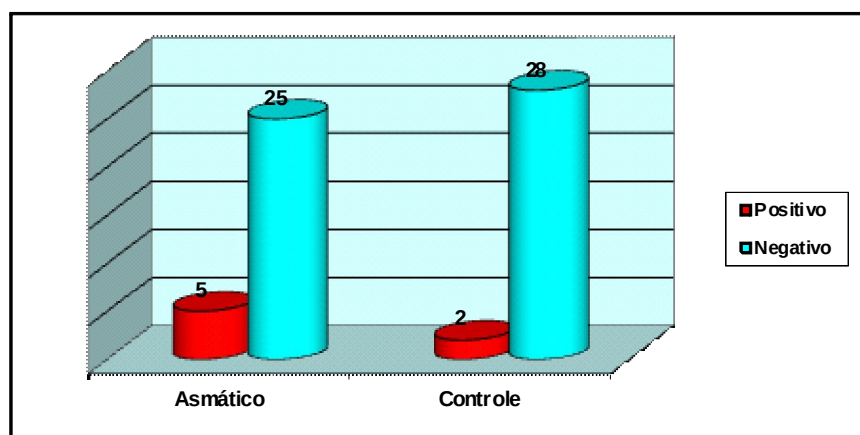


Figura 12a – Pesquisa de IgA anti-*C. pneumoniae* nos indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos grupos asmático e controle ($p = 0,42$).

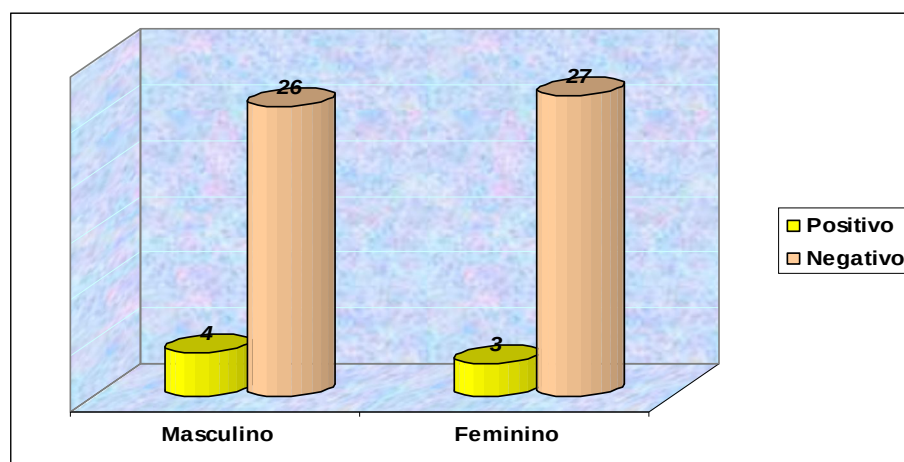


Figura 12b – Pesquisa de anticorpos IgA anti-*C. pneumoniae* em indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos sexos masculino e feminino ($p = 1,0$).

A **Tabela 4** apresenta os títulos de IgA dos pacientes positivos para esta imunoglobulina. Observamos que 2 pacientes apresentaram IgA até a diluição de 1/32, 4 até 1/64 e outro indivíduo apresentou diluição desta imunoglobulina de 1/128. Nas crianças com asma crônica a diluição de IgA variou entre 1/32 e 1/64. No entanto, a diluição com título mais alto (1/128) foi observada em um indivíduo

do sexo masculino do grupo controle. Este grupo apresentou ainda outro indivíduo com título de IgA de 1/64. Todos os outros participantes apresentaram título de IgA abaixo de 1/32 (dados não mostrados).

Em relação ao uso de corticóide, a pesquisa mostrou que dos 7 indivíduos com resultados positivos para IgA, 5 (71,4%) usavam regularmente a medicação e todos pertenciam ao grupo de asmáticos, sendo 3 masculinos e 2 femininos.

Tabela 4 - Comparação do título de IgA *anti-C. pneumoniae* por microimunofluorescência.

	Amostra Nº	Título	Sexo	Uso de Corticóide	Nº de crises ao ano	Nº de pessoas mesmo quarto
Asmático	24	1/64	M	S	1	2
	53	1/32	M	S	3	2
	54	1/64	M	S	1	6
	56	1/32	F	S	4	2
	57	1/64	F	S	<1	1
Não Asmático	41	1/64	F	NA	NA	2
	45	1/128	M	NA	NA	2

M = Masculino; F = Feminino; S = Sim; N = Não; NA = Não se aplica

Na mesma tabela também pode ser observado o número de crises asmáticas ao ano daqueles pacientes com resultado positivo para pesquisa de IgA, com valores variando de menos de uma até 4 crises por ano. É possível observar que o indivíduo com o maior número de crises apresentou título de 1/32. Outros com título de 1/64 relataram apenas uma crise.

6.2.1.2 Pesquisa de IgG

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que 9 (15%), das 60 amostras analisadas apresentaram resultado positivo para esta imunoglobulina. A **Figura 13a** mostra que 10% das crianças asmáticas foram positivas para IgG, enquanto que apenas 5% das crianças do grupo controle foram positivas para esta imunoglobulina, entretanto essa diferença não foi significativa, $p = 0,4716$. Na **Figura 13b** observa-se ainda que 5 (8,3%) das amostras positivas eram do sexo masculino e 4 (6,7%) eram do sexo feminino, também sem significado estatístico, $p > 0,05$.

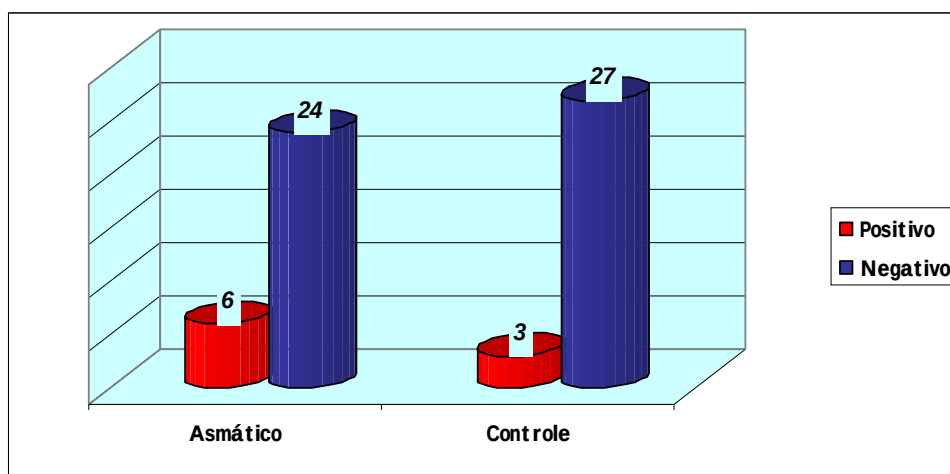


Figura 13a – Pesquisa de anticorpos IgG *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos grupos asmáticos e controle. ($p = 0,47$)

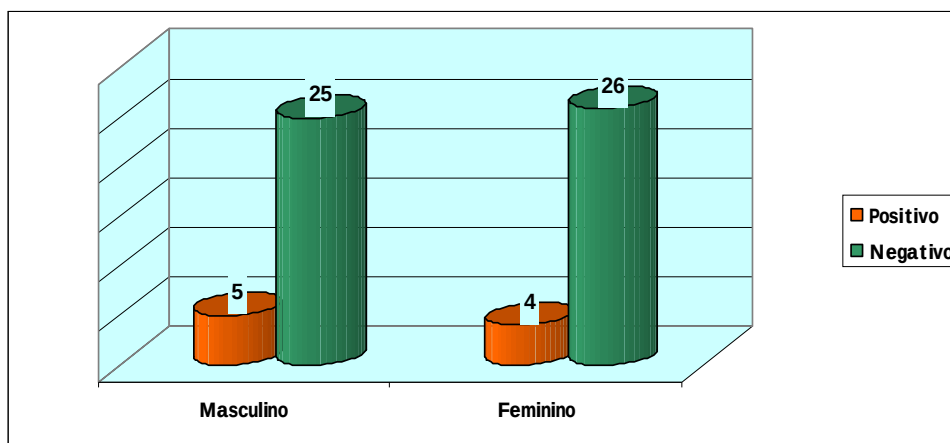


Figura 13b – Pesquisa de anticorpos IgG *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos sexos masculino e feminino. ($p > 0,05$)

A **Tabela 5** mostra que os 6 pacientes asmáticos faziam uso constante de corticóide. Destes, 4 do sexo masculino e 2 do sexo feminino. Uma amostra (5) apresentou título superior a 1/512, sugerindo infecção aguda. Os demais resultados são sugestivos de infecção passada. Outros aspectos avaliados são observados na tabela abaixo.

Tabela 5 – Comparação dos títulos de anticorpos IgG *anti-C. pneumoniae* presentes em amostras sorológicas por microimunofluorescência em indivíduos asmáticos e controle

	Amostra Nº	Título de anticorpos	Sexo	Em uso de corticóide	Nº de crises ao ano	Nº de pessoas mesmo quarto
Asmáticos	1	1/256	M	S	4	3
	5	>1/512	M	S	<1	2
	24	1/256	M	S	1	2
	54	1/64	M	S	1	6
	57	1/128	F	S	<1	1
	58	1/128	F	S	2	2
Não Asmáticos	31	>1/512	F	N	NA	4
	41	1/128	F	N	NA	2
	45	1/256	M	N	NA	2
	33	1/64 <i>C. trachomatis</i>	M	N	NA	4

M = Masculino; F = Feminino; S = Sim; N = Não; NA = Não se aplica.

Após análise da amostra 33, correspondente a um participante do sexo masculino, 6 anos de idade, observou-se resultado positivo para IgG contra *C. trachomatis* na diluição de 1/64, o que pode caracterizar infecção passada por este micro-organismo.

6.2.1.3 Pesquisa de IgM

Em relação a pesquisa destes anticorpos por microimunofluorescência, 4 amostras (6,7%) demonstraram resultados positivos, sendo 3 (5%) no grupo de

portadores de asma crônica e 1 (1,7%) no grupo controle (**Figura 14a**). Os mesmos valores foram encontrados para indivíduos do sexo masculino e feminino, respectivamente, $p = 0,61$.

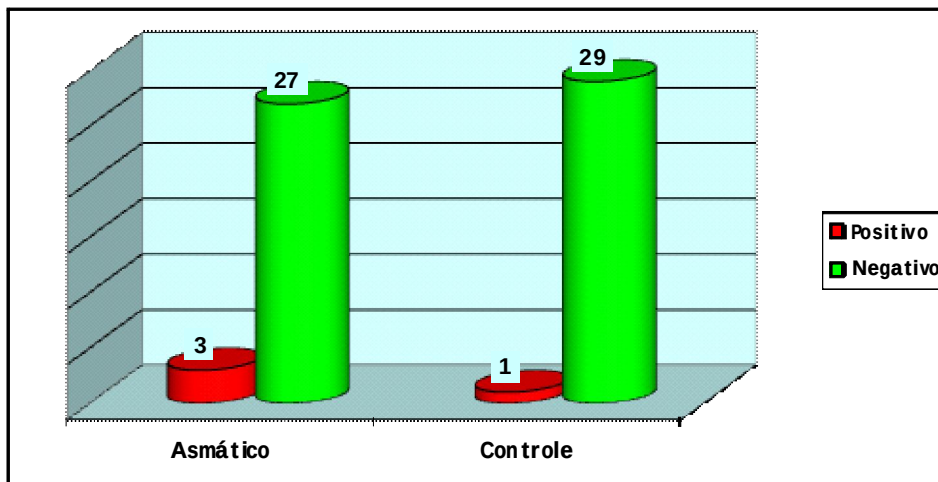


Figura 14a – Pesquisa de anticorpos IgM *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos grupos asmáticos e controle ($p = 0,61$).

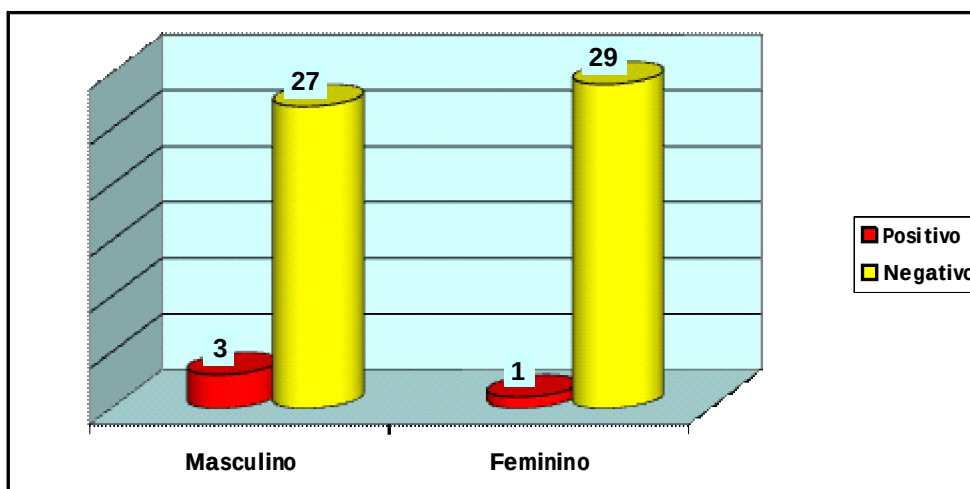


Figura 14b – Pesquisa de anticorpos IgM *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados por microimunofluorescência nos sexos masculino e feminino ($p = 0,61$).

Os resultados da **Tabela 6** mostram que a amostra nº 2 foi positiva apenas para IgM, enquanto que as amostras nº 53 e 56 foram positivas apenas para IgA. A amostra nº 24 foi positiva para os três anticorpos, enquanto que as amostras nº 1 e 58 foram positivas apenas para IgG. As amostras 54 e 57 foram positivas para

IgA e IgG. Apenas a amostra nº 5 apresentou resultados positivos para IgG, com título superior a 1/512, e IgM.

Observa-se que a amostra 31 foi positiva apenas para IgG com título superior a 1/512. A amostra 41 foi positiva para os três anticorpos e a amostra 45 apresentou resultados positivos para IgA e IgG. Importante observar que a amostra 33 apresentou resultado positivo 1/64 para *C. trachomatis*. A **Tabela 6** mostra ainda que na comparação entre os sexos, das quatro amostras positivas do sexo feminino, apenas uma pertencia ao grupo controle.

Tabela 6 – Comparação dos títulos de anticorpos IgA, IgG e IgM anti-*C. pneumoniae* detectados por MIF em amostras de soro.

	Nº Amostra	Sexo	Grupo de idade	Microimunofluorescência		
				IgA	IgG	IgM
Asmáticos	1	M	3	-	+ 1/256	-
	2	M	3	-	-	+
	5	M	3	-	+ > 1/512	+
	24	M	3	+ 1/64	+ 1/256	+
	53	M	3	+ 1/32	-	-
	54	M	1	+ 1/64	+ 1/64	-
	56	F	2	+ 1/32	-	-
	57	F	3	+ 1/64	+ 1/128	-
	58	F	3	-	+ 1/128	-
Não Asmáticos	31	F	2	-	+ > 1/512	-
	41	M	3	+ 1/64	+ 1/128	+
	45	M	2	+ 1/128	+ 1/256	-
	33	M	1	-	+ 1/64 <i>C. trachomatis</i>	-

M = Masculino; F = Feminino; - = Negativo; + = Positivo; S = Sim; N = Não

6.2.2 Pesquisa de anticorpos por ELISA

6.2.2.1 Pesquisa de IgG e IgM – Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que das 60 amostras testadas, 7 (11,7%) foram positivas na pesquisa de IgG *anti-C. pneumoniae*, sendo 4 (57,1%) do sexo masculino e 3 (42,9%) do sexo feminino, $p > 0,05$. Os mesmos percentuais acima foram observados entre os grupos controle e de asmáticos, respectivamente (**Figuras 15a e 15b**).

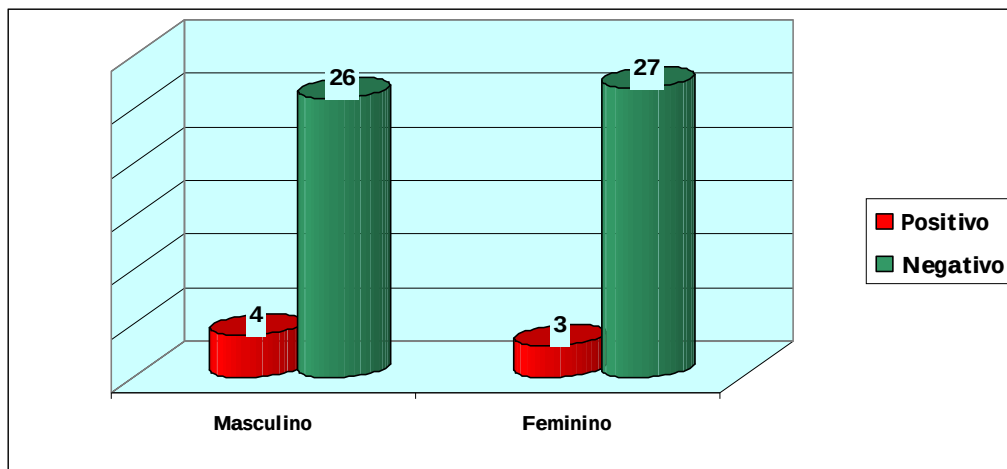


Figura 15a – Pesquisa de anticorpos IgG *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados pela metodologia de Elisa nos sexos masculino e feminino ($p > 0,05$).

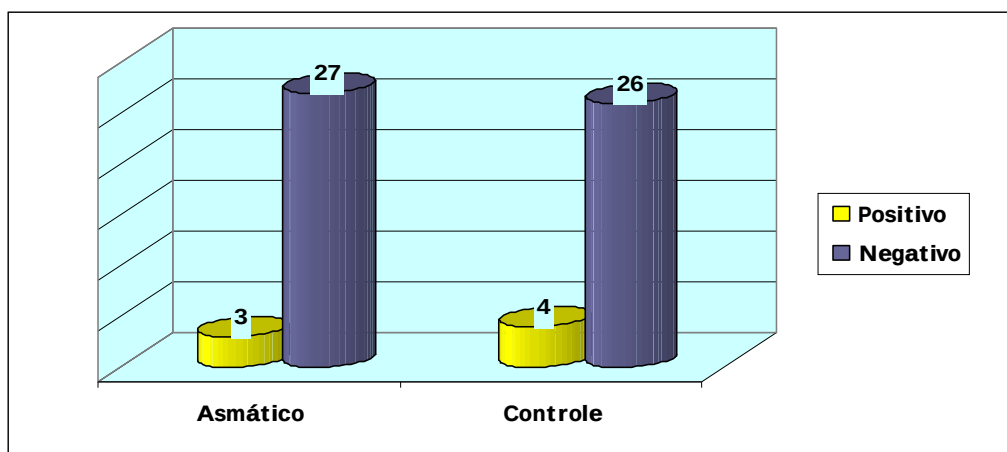


Figura 15b – Pesquisa de anticorpos IgG *anti-C. pneumoniae* em indivíduos avaliados pela metodologia de Elisa nos grupos asmáticos e controle ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Comparação de resultados positivos entre MIF e Elisa.

	Nº Amostra	Sexo	Grupo de idade	MIF		ELISA	
				IgG	IgM	IgG	IgM
Asmáticos	1	M	3	+ 1/256	-	+	-
	2	M	3	-	+		+
	5	M	3	+ > 1/512	+	+	+
	8	M	2	-	-	-	+
	15	F	2	-	-	-	IND
	24	M	3	+ 1/256	+	+	-
	54	M	1	+ 1/64	-	-	-
	57	F	3	+ 1/128	-	-	-
	58	F	3	+ 1/128	-	-	-
Não Asmáticos	3	F	2	-	-	-	IND
	27	F	2	-	-	-	IND
	28	F	3	-	-	+	-
	31	F	2	+ > 1/512	-	+	-
	33	M	1	+ 1/64 C. <i>trachomatis</i>	-	-	-
	39	F	2	-	-	-	IND
	41	M	3	+ 1/128	+	+	-
	45	M	2	+ 1/256	-	+	-

+ = Positivo; - = Negativo; S = Sim; N = Não, IND = Indeterminado. As frações representam os títulos nas reações de MIF positivas.

A **Tabela 7** mostra que dos 6 indivíduos asmáticos com resultados positivos na MIF, apenas 3 foram positivos no Elisa. Entre os indivíduos não asmáticos, três

amostras apresentaram resultados positivos em ambos os testes, enquanto uma amostra foi positiva apenas no Elisa.

Na mesma tabela observa-se que a amostra 33 foi positiva para *C. trachomatis* na MIF e negativa pelo método de Elisa. É possível observar ainda que 5 amostras positivas no Elisa eram do grupo de idade 3 e duas amostras pertenciam ao grupo 2.

Tabela 8 – Comparação resumida entre os dois métodos

	MIF		ELISA	
	IgG (%)	IgM (%)	IgG (%)	IgM (%)
Asmáticos	6 (10)	3 (5,0)	3 (5)	3 (5,0)
Controles	3 (5)	1 (1,7)	4 (6,7)	0
Masculino	5 (8,3)	3 (5,0)	4 (6,7)	3 (5,0)
Feminino	4 (6,7)	1 (1,7)	3 (5)	0

Na **Tabelas 7 e 8** observa-se que das 60 amostras testadas, 3 (5%) foram positivas, sendo todas do sexo masculino e todos os pacientes do grupo dos asmáticos, $p = 0,2373$. Levando em conta o modo de interpretação proposto pelo fabricante, 4 amostras apresentaram resultados indeterminados, ou seja, nº de UNT entre 9 e 11. Outra observação é que dos resultados indeterminados para IgM, todas são do sexo feminino. Todos estes pertencentes ao grupo de idade 2, ou seja, com idade entre 7 e 10 anos (**Tabela 7**). A mesma tabela mostra ainda que nenhum dos pacientes do grupo 1 apresentou resultados positivos para IgM nos dois testes avaliados.

Na comparação entre os métodos MIF (Microimunofluorescência) e Elisa para pesquisa de anticorpos IgG foi possível observar que houve uma concordância de 93,3%. Das 60 amostras avaliadas, 50 (83,3%) foram negativas e 6 (10%) foram positivas pelos dois métodos (alguns dados não mostrados). Uma

amostra (1,7%) positiva pelo método de Elisa foi negativa na MIF e três amostras (5%) positivas na MIF foram negativas no Elisa (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Comparação dos dois métodos de diagnósticos utilizados para a pesquisa de anticorpos IgG e IgM *anti-C. pneumoniae* em amostras sorológicas.

	MIF	ELISA	M	F	Nº ABSOLUTO	%	KAPPA
IgG	+	+	5	1	6	10,0	0,71
	-	-	24	26	50	83,3	
	+	-	1	2	3	5,0	
	-	+	0	1	1	1,7	
	TOTAL		30	30	60	100	
IgM	+	+	2	0	2	3,3	0,54
	-	-	25	26	51	85,0	
	+	-	2	0	2	3,3	
	-	+	1	0	1	1,7	
	-	IND	0	4	4	6,7	
	TOTAL		30	30	60	100	

+ = Positivo; - = Negativo; IND = Indeterminado; M = Masculino; F = Feminino.

Comparando os dois métodos para a detecção de IgM, foi possível observar 88.3% de concordância, já que das 60 amostras analisadas, 51 (85%) foram negativas e 2 (3,3%) apresentaram resultados positivos nos dois métodos. Duas amostras positivas na MIF foram negativas no Elisa e uma amostra positiva no Elisa foi negativa na MIF (**Tabela 9**). Quatro amostras apresentaram resultados indeterminados pelo Elisa e negativos na MIF. Observa-se uma boa correlação entre os métodos para a pesquisa de IgG (kappa = 0,71), mas uma correlação apenas regular para a pesquisa de IgM (kappa = 0,54).

6.3. Uso de corticóide inalado e testes sorológicos positivos – É comum o uso de corticóide inalado para o controle da asma. Há relatos de que o uso constante

deste tipo de medicamento pode contribuir para a infecção por *C. pneumoniae*. Dos 30 pacientes asmáticos que participaram do estudo, 22 relataram fazer uso constante da medicação, enquanto que 8 deles não relataram o uso de corticoide inalado. Nossa avaliação mostrou 10 destes pacientes com resultados positivos na sorologia por MIF ou Elisa quando se incluem as três classes de anticorpos. A **Tabela 10** permite observar que 10 pacientes em uso constante de corticóide inalado foram positivos para IgG, IgA ou IgM na microimunofluorescência ou Elisa. Nenhum resultado positivo foi observado entre os 8 pacientes que não faziam uso da medicação. Outros 12 pacientes relataram uso de corticoide inalado mostraram os resultados negativos. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o uso de corticóide inalado e os resultados de MIF positivos, $p = 0,0287$.

Tabela 10 – Uso de corticóide inalado comparado aos resultados positivos de IgA, IgG, IgM em microimunofluorescência (MIF) ou Elisa em indivíduos asmáticos ($p = 0,0287$).

Uso de Corticóide Inalado			
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>Total</i>
<i>MIF/ Elisa Positivo</i>	10	0	10
<i>MIF/ Elisa Negativo</i>	12	8	20
<i>Total</i>	22	8	30

7. Discussão

Os estudos envolvendo patógenos atípicos como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydophila pneumoniae* têm despertado interesse cada vez maior de pesquisadores em várias partes do mundo em virtude de sua participação em um grande número de quadros clínicos e sua dificuldade diagnóstica. As pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) são talvez a forma mais grave de doença envolvendo estes micro-organismos e estão associadas a grande morbidade e mortalidade, além de altos custos para os serviços de saúde (LIU *et al.*, 2005; WELLINGHAUSEN *et al.*, 2006; LOENS *et al.*, 2008).

Chlamydophila pneumoniae é uma bactéria intracelular obrigatória e tem sido associada a um variado número de doenças como Alzheimer, esclerose múltipla, aterosclerose, etc. Entre as doenças do trato respiratório, a bactéria tem sido associada a 10% dos casos de PAC e 5% de bronquites e faringites. A associação da infecção por *C. pneumoniae* e asma também tem sido foco de vários estudos e os resultados ainda não são conclusivos (GAYDOS *et al.*, 1992; WEBLEY *et al.*, 2005, BLASI *et al.*, 2009). A maioria dos estudos ligando a bactéria à asma tem sido conduzida em populações de adultos. Entretanto, existem evidências sugerindo que *C. pneumoniae* pode desempenhar um papel importante nos sintomas de asma em crianças (WEBLEY *et al.*, 2005).

No Brasil ainda não há dados que comprovem a participação da bactéria em episódios asmáticos, mas os impactos da asma na população brasileira se mostram profundos, atingindo crianças, jovens e adultos, acarretando altos custos para o sistema público de saúde. Assim, torna-se relevante conhecer a real participação deste micro-organismo neste panorama, na tentativa de apontar a adoção de medidas que possam de alguma forma, diminuir suas sequelas quer sejam individuais ou sociais.

Na tentativa de contribuir neste processo, investigamos pela primeira vez no Brasil a ocorrência de anticorpos específicos contra *C. pneumoniae* em crianças asmáticas e também comparamos dois métodos sorológicos utilizados no diagnóstico da infecção por *C. pneumoniae*: Microimunofluorescência e Elisa.

7.1 Avaliação da pesquisa de anticorpos anti *C. pneumoniae* e metodologia utilizada.

A pesquisa de anticorpos contra *C. pneumoniae* tem sido usada por muitos pesquisadores para a detecção de infecção aguda ou infecção passada pela bactéria. Anticorpos IgA, IgG e IgM são frequentemente encontrados em níveis elevados em indivíduos infectados.

Vários estudos têm sido feitos comparando testes sorológicos utilizados no diagnóstico da infecção por *C. pneumoniae*. Criada para a sorotipagem de *C. trachomatis* no início dos anos 70 e posteriormente adaptada por Grayston para a pesquisa de anticorpos específicos contra *C. pneumoniae*, a microimunofluorescência tem sido recomendada pelo CDC como o método sorológico de escolha para o diagnóstico desta infecção (DOWELL *et al.*, 2001). Contudo, o método também tem sido questionado pela sua subjetividade na interpretação de resultados, necessidade de treinamento específico de pessoal, falta de padronização de reagentes, altos custos, complexidade da técnica, diferentes pontos de corte para titulação das amostras e uso de ensaios desenvolvidos *in house*, gerando resultados discrepantes quando as mesmas amostras foram processadas em laboratórios diferentes (PEELING *et al.*, 2000; HAMMERSCHLAG, 2001; BENNEDSEN *et al.*, 2002). O ensaio usado em nosso estudo apresenta a vantagem de utilizar antígenos das três principais espécies de clamídias causadoras de doença em humanos, possibilitando descartar possíveis reações cruzadas entre essas espécies. Além disso, este ensaio utiliza antígenos purificados de origem da *Washington Research Foundation*, que têm sido usados como referência para avaliação de desempenho de outros testes de MIF, demonstrando resultados comparáveis (BENNEDSEN *et al.*, 2002).

Neste estudo investigamos a prevalência desses anticorpos em crianças portadoras de asma crônica comparadas com crianças controle não asmáticas. Apesar de anticorpos IgA anti *C. Pneumoniae* terem sido detectados com maior frequência em crianças asmáticas 8,3% contra 3,3% nas crianças não asmáticas, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Consideramos que o tamanho

amostral possa ser um dos fatores que explicam essa observação. Uma característica importante dos anticorpos IgA *anti-C. pneumoniae* é sua meia vida curta, em torno de 5 a 6 dias (KARNAK, 2001). Por este motivo, muitos trabalhos têm utilizado a presença de IgA como marcador de infecção crônica, nos casos em que se observa níveis persistentemente elevados, embora o CDC (*Centers and Disease Control and Prevention*) não recomende sua utilização para tal avaliação (DOWELL *et al.*, 2001). A dificuldade de se estabelecer um critério está na falta de acordo entre os vários pesquisadores sobre o título a ser usado como ponto de corte para considerar um indivíduo portador ou não de infecção crônica. Vários pontos de corte foram utilizados em diferentes estudos, desde 1/16 até 1/128. Nosso estudo demonstrou que entre os pacientes asmáticos avaliados, 3 apresentaram títulos de 1/64 e 2 de 1/32. Entre os não asmáticos os títulos de 1/64 e 1/128. Como em outros trabalhos, nossos resultados sugerem infecção crônica nestes pacientes, mas esta afirmação só seria possível se uma segunda amostra desses pacientes tivesse sido coletada em um intervalo de 3 a 4 semanas após a primeira coleta e se fossem observados valores iguais ou superiores aos previamente encontrados (DOWELL *et al.*, 2001; KARNAK, 2001). As avaliações de amostra única devem ser tomadas com cuidado e não são recomendadas pelo CDC (KUMAR & HAMERSCHALAG, 2007). O que chamou a atenção em nossos resultados foi observar que 2 amostras (53 e 56) foram positivas com título 1/32 apenas para a pesquisa de IgA. Não há na literatura nenhuma ocorrência semelhante e não é comum o achado de IgA positivo com IgG ou IgM negativos (WANG, 2000). NORMANN *et al.*, 2006 relatam que nunca se observou tal condição em seus estudos. Nós acreditamos que tal ocorrência possa ser explicada por uma possível reação cruzada com outras espécies de clamídias ou ainda outros micro-organismos. Uma outra hipótese é a própria subjetividade inerente ao método, já que a execução da microimunofluorescência depende muito da experiência e interpretação do analista. Uma terceira hipótese seria o não uso de solução adsorvente para a remoção de IgG. PALDANIUS *et al.*, em 2007, recomendam o uso de tal solução para se evitar possíveis resultados falso

positivos, embora não se tenha observado a presença de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* nestas duas amostras.

A detecção de anticorpos IgG e IgM contra *C. pneumoniae* em amostras de soro tem sido utilizada para o diagnóstico de infecção pela bactéria. Vários trabalhos têm encontrado uma associação positiva entre a infecção pela bactéria e asma crônica, mas quase todos realizados em população adulta (AGARWAL & CHANDER, 2008). Poucos estudos têm sido realizados em crianças e os resultados ainda não são conclusivos (RONCHETTI *et al.*, 2005).

Nossos resultados revelaram uma prevalência de 15% para IgG, 10% em asmáticos e 5% em controle, pela técnica de microimunofluorescência (MIF), enquanto que no teste de Elisa a prevalência foi de 11,7%, sendo 5% entre os asmáticos e 6,7% entre os indivíduos controle. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada

Fato relevante foi observar que dos indivíduos diagnosticados como positivos pela MIF na pesquisa de IgG, dois, um asmático e um controle, tinham evidência sorológica de infecção aguda, com títulos de IgG acima de 1/512, um dos quais confirmado pela presença de IgM. Os demais pacientes IgG positivos tinham evidência de infecção passada, com títulos de anticorpos variando de 1/64 a 1/256, segundo orientações do fabricante.

A prevalência de IgM por microimunofluorescência foi de 6,7% (5% entre os asmáticos e 1,7% entre os indivíduos controle) sem nenhuma significação estatística entre os grupos. A pesquisa de IgM pelo método de Elisa mostrou uma prevalência de 5%, todos no grupo dos asmáticos, sem nenhum significado estatístico. A presença deste anticorpo evidencia a infecção aguda pela bactéria. Dois pacientes mostraram evidência de infecção aguda pelos dois métodos, um paciente tinha evidência de infecção aguda apenas pelo Elisa, enquanto outros dois mostraram evidência de infecção aguda apenas pela MIF. Levando em conta o modo de interpretação proposto pelo fabricante do teste de Elisa, pode-se observar a presença de 4 resultados indeterminados. Nosso estudo mostrou que

apenas o paciente nº 24 apresentou sintomas de infecção aguda como tosse e coriza e sorologia positiva por MIF.

Nossos resultados corroboram os achados de outros autores, pois a prevalência aqui observada é semelhante àquelas encontradas em outros trabalhos. Em população pediátrica a prevalência de IgG varia de 3,5 a 44,7%, dependendo da metodologia (MIF, Elisa, EIA), da localização geográfica e ainda das características da população estudada (WANGROONGSARB, *et al.*, 2003; RONCHETTI *et al.*, 2005; BUTUN *et al.*, 2006; WAZIR *et al.*, 2007; KUMAR & HAMMERSCHLAG, 2007). Se levarmos em conta todos os resultados positivos nos dois testes utilizados em nosso estudo, MIF e Elisa, teremos uma prevalência ainda maior (25%) nos dois grupos avaliados. O uso de dois métodos para avaliar a prevalência não é incomum entre os pesquisadores (BUTUN *et al.*, 2006; KUMAR & HAMMERSCHLAG, 2007). Entretanto o uso de dois métodos como MIF e Elisa aumentam a chance de se encontrar indivíduos infectados pela bactéria (PAPPAETIS *et al.*, 2008), embora, muitas vezes, possam ocorrer resultados discordantes. BEOVIC *et al.*, em 2003, encontraram uma prevalência de 21,1%, considerando todos os anticorpos presentes. Vale ressaltar que neste trabalho duas amostras foram coletadas do mesmo paciente. Uma no momento da admissão e outra 4 semanas depois, fato que aumenta muito a chance de se encontrar evidência sorológica de infecção pela bactéria, já que os anticorpos IgM normalmente ocorrem em concentrações detectáveis em torno da terceira semana após o início dos sintomas, enquanto IgG ocorrem entre a sexta e oitava semanas (WANG, 2000). O uso de amostras pareadas permite observar as variações nos níveis de anticorpos, oferecendo uma maior precisão no diagnóstico sorológico. Em nosso estudo apenas uma amostra de sangue foi coletada de cada paciente. Este procedimento pode ter contribuído inclusive para o fato de não encontrarmos diferenças estatísticas entre os dois grupos avaliados.

O diagnóstico sorológico de infecção aguda por *C. pneumoniae* pode ser feito em amostra única desde que os títulos de IgM estejam maiores que 1/16 e os títulos de IgG acima de 1/512, (DOWELL *et al.*, 2001). Desta forma, aqueles indivíduos identificados em nosso estudo com estes níveis de anticorpos eram de

fato portadores de infecção aguda por *Chlamydophila pneumoniae*. O resultado destas avaliações poderia ser maior se uma segunda amostra tivesse sido coletada de cada paciente, uma vez que a infecção aguda também pode ser diagnosticada sorologicamente pelo encontro de aumento de quatro vezes nos títulos de IgG (DOWELL *et al.*, 2001).

A comparação entre os métodos mostrou uma boa concordância. Para a pesquisa de IgG, 93,3% e 88,3% para a pesquisa de IgM. No entanto, a correlação entre os métodos mostrou-se boa para o IgG e apenas regular para a pesquisa de IgM.

Considerando como padrão ouro a microimunofluorescência, o teste de Elisa para detecção de anticorpos IgG contra *C. pneumoniae* apresentou sensibilidade de 66,7% e especificidade de 98%. O valor preditivo negativo foi 94,3% e o valor preditivo positivo foi de 85,7%. Em comparação com a microimunofluorescência (padrão ouro), o teste de Elisa para detecção de anticorpos IgM apresentou sensibilidade e especificidade de 50 e 98%, e os valores preditivos negativo e positivo foram 96,2 e 66,7%, respectivamente.

Como a sensibilidade é a capacidade que um teste possui de identificar os indivíduos verdadeiramente positivos e a especificidade corresponde à capacidade do teste de indicar os indivíduos verdadeiramente negativos, os testes com alta especificidade devem ser usados para confirmar um diagnóstico e testes com alta sensibilidade são importantes quando o objetivo é realizar uma triagem de determinada doença. Desta forma, com base nos valores encontrados, o teste de Elisa tanto para a detecção de anticorpos IgG, quanto para anticorpos IgM, demonstrou ser um bom teste se o objetivo for a confirmação do diagnóstico de infecção por *C. pneumoniae*, uma vez que sua especificidade foi de 98%. Por outro lado, a sensibilidade foi baixa, demonstrando não ser um bom teste para triagem de indivíduos com suspeita de infecção.

Com relação aos valores preditivos positivo e negativo, sabe-se que VPP expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença e VPN expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença.

Assim, o teste de Elisa pode ser usado para confirmar ausência de infecção por *C. pneumoniae*, mas não deve ser usado para a confirmação da doença. Entretanto, devemos destacar a importância da realização de testes baseados na detecção de ácidos nucleicos, uma vez que há relatos na literatura de indivíduos, especialmente crianças, com sorologia negativa e testes moleculares positivos (KUTLIN, 1998, KUMAR & HAMMERSCHLAG, 2007). HVIDSTEN *et al.*, 2009 mostraram que a técnica de PCR foi capaz de detectar a presença da bactéria mais precocemente em amostras do trato respiratório (durante a primeira semana da doença) que as técnicas baseadas em pesquisa sorológica de anticorpos, embora a sensibilidade da PCR tenha sido menor em relação aos testes sorológicos utilizados para detecção de infecção aguda.

Um número crescente de ensaios baseados na técnica de Elisa ou ensaios imunoenzimáticos (EIE) têm sido colocados no mercado. Muitos são espécie específicos e outros gênero específicos. Estes últimos usam como antígenos moléculas de LPS ou LPS recombinantes para detecção de anticorpos. Apresentam, porém a desvantagem de possíveis reações cruzadas entre espécies de clamídias e até outras bactérias, principalmente *B. pertussis* (HAMMERSCHLAG, 2001). Os ensaios baseados em Elisa e EIE apresentam várias vantagens sobre a MIF, como objetividade, possibilidade de automação, simplicidade da técnica, ponto final definido e são promissores no sentido de facilitar o sorodiagnóstico da infecção. Apesar do grande número de ensaios comercialmente disponíveis, até o momento nenhum deles recebeu aprovação do FDA e, portanto, seu uso na rotina laboratorial não é recomendado pelo CDC (DOWELL, 2001). Uma grande desvantagem destes ensaios é o uso de antígenos diferentes nos vários *kits* comerciais disponíveis e seus problemas com sensibilidade e especificidade (HERMMANN *et al.*, 2002; PORTIG *et al.*, 2003). Trabalho recente comparou 7 *kits* comerciais de EIE e Elisa para pesquisa de IgG com 4 ensaios de MIF e foi observado que a sensibilidade e especificidade dos testes espécie específicos variaram de 95 a 100% e 58 a 100%, respectivamente (HERMMANN *et al.*, 2002). O mesmo trabalho também mostrou que alguns testes de Elisa e EIE falharam em detectar baixos títulos de IgG detectados pela MIF.

Situação semelhante foi observada em nosso estudo, no qual o teste de Elisa utilizado demonstrou melhor desempenho naquelas amostras que apresentavam títulos iguais ou superiores a 1/128, sensibilidade e especificidade bem próximas às aquelas encontradas por Hermmann *et al.*, em 2002. Em outro trabalho, os autores compararam 4 *kits* baseados em EIE e Elisa com um ensaio de MIF utilizado como referência. Os resultados mostraram que a sensibilidade e especificidade variaram entre 62 a 97% e 71 a 87%, respectivamente. Importante nesta comparação foi observar que a soroprevalência encontrada sofreu bastante influência de acordo com o *kit* comercial utilizado, variando de 49 a 80%. Os autores concluíram que a escolha do método sorológico para o diagnóstico da infecção tem importantes implicações, especialmente em trabalhos com objetivos epidemiológicos (HOYMANS *et al.*, 2003). No presente estudo a prevalência não mostrou grande variação, especialmente na detecção de IgM, sugerindo assim que os testes não influenciaram nos resultados observados.

Um achado importante observado em nosso estudo foi a pesquisa positiva para IgG contra *C. trachomatis* (1/64) pela MIF em um paciente do grupo controle. Este resultado foi confirmado após repetição e diluição seriada da amostra até o título de 1/512 (dados não mostrados). Não foi objetivo do nosso trabalho identificar indivíduos com sorologia positiva para *C. trachomatis*. No entanto, consideramos vantajoso utilizarmos um *kit* que nos permitiu fazer tal observação, pois é sabido que esta bactéria pode ser transmitida pela mãe durante o nascimento, podendo ser causa de infecções persistentes e assintomáticas em crianças e pode levar ao desenvolvimento de doença do trato respiratório. Nós consideramos verdadeiro este achado e descartamos qualquer possibilidade de reação cruzada com outros micro-organismos ou observação de fluorescência inespecífica do teste, uma vez que o ensaio foi repetido em triplicata e diluído, com resultados bem reprodutivos.

Vários autores relatam infecção por *C. trachomatis* em neonatos que se infectam durante a passagem pelo canal de parto de mães infectadas (NUMAZAKI, 1998; CHEN *et al.*, 2007). Entre a quarta e décima segunda

semanas de vida é comum o encontro da bactéria em secreções respiratórias de crianças nascidas nestas condições e o micro-organismo tem sido apontado como responsável por quadros de pneumonia em até 17% destes indivíduos (DARVILLE, 2005). Em estudo conduzido em Taiwan com crianças até seis meses de idade CHEN *et al.*, em 2007, relataram sorologia positiva em 30% dos participantes, todos com resultado positivo na cultura de aspirados da nasofaringe. Há relatos de que tais indivíduos podem permanecer infectados por até 29 meses, período no qual a bactéria pode ser isolada da nasofaringe (DARVILLE, 2005). Há ainda outros relatos de que a infecção pode persistir por tempo ainda maior (WEBLEY, 2005). No presente estudo, a sorologia positiva para *C. Trachomatis* foi vista em um paciente de 6 anos de idade. Este resultado está de acordo com trabalhos recentes. Um estudo conduzido na Turquia demonstrou que 3% dos 100 indivíduos entre 2 meses e 20 anos de idade tinham sorologia positiva para *C. Trachomatis* (BUTUN *et al.*, 2005). Mais recentemente, um estudo analisando o lavado bronco alveolar de crianças entre 0 e 15 anos de idade demonstrou a existência de *C. trachomatis* em 42,3% dos 182 pacientes pesquisados utilizando métodos moleculares. A bactéria foi encontrada em todos os grupos de idade avaliados e este foi o primeiro relato de detecção da bactéria no tecido pulmonar de pacientes (WEBLEY *et al.*, 2009). Em nosso estudo seria recomendada a obtenção de mais dados do paciente, bem como a coleta de amostras para pesquisa de antígenos de *C. trachomatis*, principalmente com o auxílio de ferramentas moleculares.

7.2 Avaliação da transmissão da infecção e caracterização da população estudada.

No presente estudo não foi possível observar variações sazonais devido ao período de coleta das amostras. A coleta de amostras não ocorreu de forma homogênea, concentrando-se em alguns meses, em virtude de os responsáveis nem sempre terem disponibilidade para conduzirem as crianças ao serviço de saúde.

Não são muitos os trabalhos que têm abordado o aspecto das variações do número de infecções durante as épocas do ano. Entre estudos, um levantamento realizado na cidade do Porto em Portugal, durante um período de dois anos e meio, os autores não observaram nenhum predomínio sazonal (CORREIA *et al.*, 2005). No entanto, a maioria dos trabalhos que utilizaram métodos sorológicos para a detecção de anticorpos contra *C. pneumoniae* tem mostrado que os meses de inverno apresentam maior prevalência de infecção pela bactéria (O'NEIL *et al.*, 1999; MONNO *et al.*, 2001; PALDANIUS *et al.*, 2007; SIDAL *et al.*, 2007). Relatos na Finlândia mostram que 47,1% das infecções agudas também ocorrem no inverno (JUVONEN *et al.*, 2008). Deve-se destacar aqui que o modo de transmissão contribui muito para a maior ocorrência no inverno já que neste período as pessoas permanecem mais tempo em ambientes fechados, dividindo os mesmos espaços. Populações diferentes foram avaliadas em estudos que confirmaram a presença de infecção sintomática ou de anticorpos contra a bactéria, quando os indivíduos viviam em ambientes que propiciavam maiores aglomerações de pessoas (HAMMERSCHLAG, 2000; PRINCIPI & ESPOSITO, 2001; HAMMERSCHLAG, 2007; PALDANIUS *et al.*, 2007; OKTEM *et al.*, 2007).

Uma vez que a proximidade de pessoas pode ser um fator determinante para a transmissão de micro-organismos associados a infecções pulmonares, buscamos também avaliar alguma relação entre o número de pessoas que dormiam no mesmo quarto, número de cômodos da residência e a transmissão da infecção. Os dados obtidos não nos permitiram estabelecer uma relação entre estes aspectos avaliados. Não foi observada qualquer diferença entre os indivíduos que dividiam o mesmo quarto com outras pessoas e aqueles que dormiam sozinhos.

Quanto à localização da residência dos indivíduos envolvidos no estudo não houve qualquer diferença estatisticamente significativa entre aqueles que residiam em Belo Horizonte e aqueles que moravam na região metropolitana ou interior.

O aumento na incidência mundial de asma tem despertado interesse cada vez maior de pesquisadores em várias partes do mundo. Levantamento da OMS

aponta para um aumento relevante nas últimas três décadas e entre as crianças a doença representa a quarta causa mais importante de incapacidade temporária e uma das principais razões para o absenteísmo escolar (MILLER, 2001; KING *et al.*, 2004). Vários fatores têm sido apontados como causas para este aumento, entre eles: industrialização, modo de vida, hábitos alimentares, condição socioeconômica, poluição do ar, exposição a alérgenos ou produtos químicos, entre outros (MILLER, 2001; KING *et al.*, 2004; BRINKE, 2008).

Investigações recentes têm demonstrado uma menor incidência de asma e alergia entre crianças que vivem em áreas rurais e que mantêm contato com animais em comparação com crianças que vivem nas cidades nos seus primeiros seis meses de vida. Foi sugerido que as primeiras ficam expostas a um maior número de agentes infecciosos ou a maiores níveis de endotoxinas, conferindo-lhes um efeito protetor contra doenças alérgicas e asma, condição esta denominada “Hipótese Higiene” (MARTIN, 2006). Nosso estudo não permitiu tal avaliação.

Na comparação entre os grupos de idade, considerando qualquer um dos três tipos de anticorpos, dos 10 pacientes IgG positivos, 7 (5 asmáticos e 2 não asmáticos) pertenciam ao grupo 3 (11 a 15 anos).

A pesquisa de anticorpos *anti C. pneumoniae* em crianças ainda representa um desafio para os pesquisadores. Frequentemente são relatados resultados negativos em crianças mais jovens. Estudos revelam que mais de 50% das crianças menores de 5 anos com cultura positiva documentada não apresentam qualquer anticorpo detectável contra *C. pneumoniae* por microimunofluorescência ou Elisa (KUTLIN *et al.*, 1998; HAMMERSCHLAG, 2007). Em um estudo realizado com 284 crianças de 5 a 15 anos que apresentavam quadro de infecção respiratória, apenas 10 demonstraram resultados positivos para IgG por microimunofluorescência, sendo que 7 tinham entre 5 e 9 anos de idade, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos de idade avaliados (SIDAL *et al.*, 2007). Outros estudos mostram aumento na frequência de anticorpos com o aumento da idade, podendo chegar a 50% em

crianças de 10 a 15 anos de idade (PRINCIPI *et al.*, 2001; MIYASHITA *et al.*, 2002; CORREIA *et al.*, 2005; NORMAM *et al.*, 2006).

Em nosso estudo também observamos que o grupo de maior frequência foi o grupo 3, ou seja, crianças de 11 a 15 anos de idade, mostrando acordo com a maioria dos trabalhos. Na comparação deste grupo com os demais, observou-se um valor de $p=0,0729$, valor este bem próximo de uma significação clínica. Condição semelhante foi observada na avaliação sorológica por microimunofluorescência de 172 crianças e jovens de 1 a 18 anos de idade em Israel, onde os achados revelaram diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos de idade avaliados (BEN-YAAKOV *et al.*, 2002). Uma hipótese que poderia explicar estes achados é o fato de que algumas crianças não desenvolvem níveis de anticorpos detectáveis nos testes diagnósticos utilizados, especialmente quando muito jovens, talvez por incapacidade do sistema imune ou baixa sensibilidade dos testes diagnóstico utilizados (RONCHETTI *et al.*, 2005; NORMAM *et al.*, 2006).

A falta de reatividade à MIF observada em crianças pode ser também relacionada à falta de reatividade à MOMP, a principal proteína de superfície de Chlamydiaceae. Estudo de KUTLIN *et al.*, 1998, mostrou que quando soro de crianças com cultura positiva e MIF negativa foi examinado por *immunoblotting*, mais de 89% apresentavam anticorpos dirigidos contra outras proteínas de *C. pneumoniae*, mas apenas 24% reagiram com a MOMP. A MOMP não parece ser imunodominante na resposta imune *C. pneumoniae*, embora tenha sido demonstrado ser imunodominante nas infecções por *C. trachomatis* (HAMMERSCHLAG, 2000)

Não observamos qualquer diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo, embora tenhamos demonstrado um maior número de indivíduos do sexo masculino com resultados positivos tanto na microimunofluorescência quanto no teste de Elisa, corroborando os dados da literatura.

A maioria dos trabalhos feitos em população adulta revelou uma maior prevalência de homens infectados pela bactéria em relação ao número de

mulheres (MIYASHITA *et al.*, 2002; PASTERNAK *et al.*, 2005). Os estudos epidemiológicos feitos até o momento não foram capazes de identificar a razão para este aumento de frequência observado em indivíduos do sexo masculino. Em crianças até 14 anos de idade não se tem observado diferenças significativas em vários estudos que utilizaram tanto a sorologia quanto métodos moleculares ou cultivo da bactéria (PRINCIPI & ESPOSITO, 2001; MYIASHITA *et al.*, 2002; BEN-YAAKOV *et al.*, 2002). Crianças em idade escolar frequentemente são infectadas por *C. pneumoniae* e, até o momento, as observações são que meninos e meninas estão igualmente expostos. No entanto, assim como em nosso trabalho, DAL MOLIN *et al.* (2005), também observaram maior prevalência de anticorpos IgG em crianças do sexo masculino de 5 a 12 anos de idade numa avaliação sorológica por microimunofluorescência e EIE. Por outro lado, NORMANN, em 2006, demonstrou uma associação positiva restrita a meninas quando se comparou a presença de IgG *anti C. pneumoniae* e chiado.

O último aspecto abordado neste estudo foi o uso de corticóide inalado pelos pacientes asmáticos e a infecção por *C. pneumoniae*. Vale ressaltar aqui que os pacientes que fazem uso da medicação, no lugar de inalar pela boca, inspiram a medicação pelas narinas, conforme orientação da equipe de fisioterapeutas e pneumologistas. Entre os nossos pacientes asmáticos 22 (73,3%) relataram uso constante de corticóide inspirado e 8 (26,7%) relataram não fazer uso da medicação. Dos pacientes em uso de corticóide 10 (45,5%) apresentaram algum resultado positivo na sorologia, enquanto todos os indivíduos não tratados com corticóide apresentaram resultados negativos, $p=0,0287$. Observamos uma associação positiva entre o uso da medicação e a infecção pela bactéria. Nossos resultados estão em acordo com vários estudos na literatura, como o de BLACK *et al.* (2000) que estudando pacientes adultos, constataram que a presença de altos títulos de anticorpos *anti C. pneumoniae* estava diretamente relacionada à dose de corticóide inalado por cada paciente. O estudo não excluiu a possibilidade de que altas doses da medicação predisponham tais indivíduos à infecção pela bactéria. Nosso estudo também não descarta a possibilidade de que o uso constante de corticóide inalado (inspirado) possa predispor tais indivíduos à infecção, uma vez

que apenas pacientes em uso da medicação apresentaram evidência sorológica de infecção em relação àqueles que não usavam. Em modelo animal, LAITINEN *et al.* (1996) detectaram reativação de infecção em camundongos após tratamento com cortisona. Atualmente o uso de corticóide inalado para tratamento de pacientes asmáticos crônicos, tanto adultos como crianças, é considerada a primeira escolha para controle dos efeitos inflamatórios provocados pela doença. Tais medicamentos atuam inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias tanto no tecido pulmonar quanto nas vias aéreas superiores, o que justifica seu uso na terapia *anti*-asma (von HERTZEN, 2002). No entanto, estudos vem indicando que o uso deste tipo de medicamento em indivíduos asmáticos infectados por *C. pneumoniae* pode levar à formação de formas aberrantes que podem estar ligadas à infecção crônica persistente (HAMMERSCHLAG, 2000; BYRNE *et al.*, 2001). Há relatos de que, *in vitro*, *C. pneumoniae* teve crescimento aumentado em duas vezes quando células HEp-2 foram tratadas com dipropionato de fluticasona, beclometsona e hidrocortisona succinato, medicamentos muito usados atualmente para controle da asma (KOMURA *et al.*, 2003). Em estudo realizado em 2009, SASAKI *et al* não encontraram diferenças significativas entre indivíduos asmáticos em uso de corticóide inalado e aqueles que não fazem uso da medicação. Esses autores afirmam que a inalação ocorre pela boca e sua concentração na garganta é maior do que na nasofaringe. Entretanto, em nosso estudo os pacientes avaliados fazem uso da medicação inspirando a medicação pelas narinas, fato que contribui para maior concentração dos medicamentos na nasofaringe, ao contrário do estudo citado acima.

Por fim, nós acreditamos que o nosso pequeno tamanho amostral tenha sido um fator de grande influência em nossas avaliações. No entanto, ainda assim foi possível identificar uma relação positiva entre o uso de corticóide inalado e a infecção por *C. pneumoniae*, podendo sugerir uma discussão no que diz respeito ao tratamento e controle da asma.

8. Conclusões e Perspectivas

A prevalência de anticorpos observada confirma dados da literatura. Entretanto, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre asmáticos e não asmáticos.

Confirmamos também a natureza assintomática da infecção aguda pela bactéria, uma vez que apenas um paciente apresentou sintomas leves da infecção.

Os dois métodos apresentaram boa concordância, mas o Elisa se mostrou menos sensível que a MIF na detecção de anticorpos, embora tenha apresentado alta especificidade. O teste de Elisa mostrou melhor desempenho para a detecção de IgG, com de 94,3 e 85,7, respectivamente e boa correlação com a MIF, podendo-se recomendar o seu uso para este fim. No entanto, para a pesquisa de IgM os mesmos valores preditivos negativo e positivo foram de 96,2 e 66,7 e correlação apenas regular com a MIF. Sendo assim o teste não pode ser validado para esta pesquisa. Conclui-se, portanto, que a microimunofluorescência continua sendo o método de escolha para o diagnóstico sorológico da infecção por *Chlamydomydia pneumoniae*.

Apesar de não se observar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (asmáticos e não asmáticos) quanto à infecção pela bactéria, nosso estudo mostrou uma clara tendência de uma maior prevalência de infecção entre os asmáticos, mostrando a necessidade da inclusão de um número maior de participantes em estudos posteriores.

A utilização de outras ferramentas diagnósticas, como métodos baseados nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) e outros que pesquisam a viabilidade da bactéria, como métodos de cultivo em células, na tentativa de melhor avaliar a relação da infecção pela bactéria em indivíduos asmáticos, bem como sua verdadeira participação na asma, devem ser avaliados para estudos posteriores.

Apesar do pequeno tamanho amostral, o presente estudo permitiu a detecção de uma relação entre o uso de corticóide inalado (no caso dos pacientes avaliados, corticóide inspirado) e a infecção pela bactéria ($p < 0,05$), sugerindo

que o uso desta medicação pode predispor os indivíduos à infecção por *C. pneumoniae*.

Nossa pesquisa não foi capaz de detectar qualquer predomínio sazonal em relação à infecção, bem como qualquer relação significativa entre a transmissão da infecção, o número de cômodos das residências e o número de indivíduos que dormiam no mesmo quarto. Da mesma forma, não foi possível detectar diferenças significativas quanto à localização da residência, se em área rural ou área urbana. Todos estes aspectos poderão ser mais bem investigados com um aumento do número participantes na pesquisa.

Observamos também maior prevalência entre indivíduos mais velhos, confirmando dados da literatura que mostram aumento da detecção de anticorpos com o aumento da idade, mas não podemos deixar de recomendar o uso de outros métodos diagnóstico (moleculares e cultivo da bactéria) para melhor avaliação deste aspecto.

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil com o objetivo de investigar a relação entre a infecção por *Chlamydia pneumoniae* e asma. Várias questões continuam sem respostas e os desafios para alcançá-las são numerosos. Assim, este trabalho pretendeu dar um primeiro passo com o objetivo de melhor entender o real papel da bactéria na asma, bem como suas implicações para a saúde dos indivíduos.

9. Referências Bibliográficas

A. AGARWAL & Y. CHANDER. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and bronchial asthma: Is there a link? *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 26 n.4, p. 338-41, 2008.

AIRENNE, S.; SURCEL, H.; ALAKÄRPPÄÄ, H. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* Infection in Human Monocytes. *Infection and Immunity*. v. 3, n. 67, p. 1445-1449, 1999.

ALLEGRA, L.; BLASI, F.; CENTANNI, S. *et al.* Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *European Respiratory Journal*. v. 7, p. 2165 – 2168, 1994.

ANNAGÜR, A.; KENDIRLI, S. G.; YILMAZ, M. *et al.* Is there any relationship between asthma and asthma attack in children and atypical bacterial infections; *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Helicobacter pylori*? *Journal of Tropical Pediatrics Advance Access published on May 29, 2007, DOI 10.1093/tropej/fmm040*.

BEATTY, W. L.; MORRISON, R. P.; BYRNE, G. I. Persistent *Chlamydiae*: from cell culture to a paradigm for Chlamydial pathogenesis. *Microbiology Reviews*. V. 58, n. 4, p. 686-699, 1994.

BENGUIGUI, Y. As infecções respiratórias agudas na infância como problema de saúde pública. *Boletim de Pneumologia Sanitária*. v. 10, n. 1, 2002.

BENNEDSEN, M.; BERTHELSEN, L.; LIND, I. *et al.* Performance of Three Microimmunofluorescence Assays for Detection of *Chlamydia pneumoniae* Immunoglobulin M, G, and A Antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 9, n. 4, p. 833–839, 2002.

BEN-YAAKOV, M.; ESHEL, G.; ZAKSONSKI, L. *et al.* Prevalence of antibodies to *Chlamydia pneumoniae* in an Israeli population without clinical evidence of respiratory infection. *Journal of Clinical Pathology*. v. 55, p. 355-358, 2002.

BEOVIC', B.; BONAE, B.; KESE, D. *et al.* Aetiology and clinical presentation of mild community-acquired bacterial pneumoniae. *Europe Journal Clinical Microbiology infectious disease*. v. 22, p. 584-591, 2003.

BISCIONE, G.L.; CORNE, J.; CHAUHAN, A.J.; JOHNSTON, S.L. Increased frequency of detection of *Chlamydophila pneumoniae* in asthma. *European Respiratory Journal*. v. 24, p. 745–749, 2004.

BLACK P. N.; SCICCHITANO, R.; JENKINS, C. R. *et al.* Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *European Respiratory Journal*. v. 15, p. 254-259, 2000.

BLACK, P. N. Antibiotics for the treatment of asthma. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 7, p. 1-6, 2007.

BLASI F. Atypical pathogens and respiratory tract infections. *European Respiratory Journal*. v. 24, p. 171-181, 2004.

BLASI, F. & JOHNSTON, S. L. The role of antibiotics in asthma. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 29, p. 485-493, 2007.

BLASI, F.; TARSIA, P. AND ALIBERTI, S. *Chlamydophila pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*. v. 15, p. 29–35, 2009.

BOMAN, J.; ALLARD, A.; PERSSON, K. *et al.* Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by Nested Touchdown Polymerase Chain Reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 175, p. 1523-1526, 1997.

BOMAN, J.; GAYDOS, C. A.; QUINN, T. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 37, n. 12, p. 3791-3799, 1999.

BOMAN, J. & HAMMERSCHLAG, M. R. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 15, n. 1, p. 1-20, 2002.

BRANDÉN, E.; KOVI, H.; GNARPE, J. *et al.* Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection is a risk factor for the development of COPD. *Respiratory Medicine*. v. 99, p. 20-26. 2005.

BRINKE, A. T. Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v. 8, p.63–69, 2008.

BUSH, A. Diagnosis of asthma in children under five. *Primary Care Respiratory Journal*. v. 16, n.1, p. 7-15, 2007.

BÜTÜN, Y.; KÖSE, S.; BABAYÝĐÝT, A. *et al.* *Chlamydia* and *Mycoplasma* serology in respiratory tract infections of children. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*. v. 54, n. 3, p. 254-258, 2006.

BYRNE, G. I. & OJCIUS, D. M. Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. v. 2, p. 802-808, 2004.

CAMPBELL, L. A.; MELGOSA, M. P; HAMILTON, D. J. *et al.* Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 30, n. 2, p. 434-439, 1992.

CAMPBELL, L. A.; KUO, C. C.; GRAYSTON, J. T. *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerging Infectious Diseases*. v. 4, n. 4, p. 571-579, 1998.

CAMPBELL, L. A. & KUO, C. C. *Chlamydia pneumoniae* – an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nature Reviews Microbiology*. v. 2, 2004.

CASSELL, G. H. Infectious causes of chronic inflammatory diseases and cancer. *Emerging Infectious Diseases*. v. 4, n. 3, p. 475-787, 1998.

CASSON, N.; ENTENZA, J. M.; GREUB, G. Serological cross-reactivity between different *Chlamydia*-Like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 45, n. 1, p. 234-236, 2007.

CHEDID, M. B.; CHEDID, M. F.; ILHA, D. O. *et al.* Community-Acquired Pneumonia by *Chlamydophila Pneumoniae*: A Clinical and Incidence Study in Brazil. 2005. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 11, n. 1, p. 75-82, 2007.

CHEN, C.J.; WU, K.G.; TANG, R.B. *et al.* Characteristics of *Chlamydia trachomatis* infection in hospitalized infants with lower respiratory tract infection. *J. Microbiology immunology infection*. v. 40, p. 255-259, 2007.

CONSENTINNI, R.; TARSIA, P.; CANETTA, C. *et al.* Severe asthma exacerbation: role of acute *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respiratory Research*. v. 9, n. 48, 2008.

COOK, P. J.; DAVIES, P.; TUNNICLIFFE, W. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* and asthma. *Thorax*. v. 53, p. 254-259, 1998.

CORREIA, P.; BRITO, M. J.; NEVES, C.; FERREIRA, G. C.; MACHADO, M. C. Infecção respiratória: a *Chlamydia pneumoniae*. *Acta Médica Portuguesa*. v. 18, p.315-322, 2005.

CORSARO, D. & GREUB, G. Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clinical of Microbiology Reviews*. v. 19, n. 2, p. 283-297, 2006.

CUNHA, B. A. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 12, Supl.3, p. 12–24, 2006.

CUNNINGHAM, A. F.; JOHNSTON, S. L.; JULIOUS, S. A. *et al.* Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbations in children. *European Respiratory Journal*. v. 11, p. 345-349, 1998.

DAL MOLIN, G., LONGO, B., NOT, T., POLI, A., CAMPELLO, C. A population based seroepidemiological survey of *Chlamydia pneumoniae* infection in schoolchildren. *Journal of Clinical and Pathology*. v 58, p. 617-620, 2005.

DARVILLE, T. *Chlamydia trachomatis* Infections in Neonates and Young Children. *Seminars in Pediatrics Infectious Diseases*. v. 16, p. 235-244, 2005.

DAUTRY-VARSAT, A.; SUBTIL, A. ; HACKSTADT, T. Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cellular Microbiology*. V. 7, n. 12, p.1714–1722, 2005.

DOUGLASS, Jo A. & O'HEHIR, R. E. What Determines Asthma Phenotype? Respiratory Infections and Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 161, Sup. 211- 214, 2000.

DOWELL, S. F.; PEELING, R. W.; BOMAN, J. *et al.* Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clinical Infectious Diseases*. v. 33, p.492-503, 2001.

ESPOSITO, S.; BOSIS, S.; BEGLIATTI, E. *et al.* Acute tonsillopharyngitis associated with atypical bacterial infection in children: Natural history and impact of macrolide therapy. *Clinical Infectious Diseases*. v. 43, p. 206-209, 2006.

EVERETTI, K. D. E. & ANDERSEN, A. A. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-RFLP. *International Journal of Systemic Bacteriology*. v. 49, p. 803-813, 1999.

EVERETTI, K. D. E.; BUSH, R. M. & ANDERSEN, A. A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. Nov. and *Simkaniaceae* fam. Nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systemic Bacteriology*. v. 49, p. 415-440, 1999.

EWIG, S.; TORRES, A. Is *Chlamydia pneumoniae* an important pathogen in patients with community-acquired pneumonia? *European Respiratory Journal*. v. 21, p. 741–742, 2004.

FAÇANHA, M. C; PINHEIRO, A. C. Doenças respiratórias agudas em serviços de saúde entre 1996 e 2001, Fortaleza, CE. *Revista de Saúde Pública*. v.38, n.3, p. 346 – 350, 2004.

FLETCHER, R. H., FLETCHER, S. W., WAGNER, E. H. *Epidemiologia Clínica*. Porto Alegre, Artes Médicas, 3ª ed. (1991).

FLORES, R.; LUO, J.; CHEN, D. *et al.* Characterization of the hypothetical protein Cpn1027, a newly identified inclusion membrane protein unique to *Chlamydia pneumoniae*. *Microbiology*. v. 153, p. 777-786, 2007.

GAYDOS, C. A.; QUINN, T. C. & EIDEN, J. J. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 30, n. 4, p. 796-800, 1992.

GAYDOS, C. A.; ROBLIN, P. M.; HAMMERSCHLAG, M. R. *et al.* Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 32, p. 903 – 905, 1994.

GAYDOS, C. A.; SUMMERSGILL, J. T.; SAHNEY, N. N. *et al.* Replication of *Chlamydia pneumoniae* In Vitro in Human Macrophages, Endothelial Cells, and Aortic Artery Smooth Muscle Cells. *Infection and Immunity*. v. 64, n. 5, p. 1614-1620, 1996.

GENCAY, M.; RUDIGER, J. J.; TAMM, M. *et al.* Increased frequency of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in patients with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 163, p. 1097-1100, 2001.

GODOY, D. V.; DAL ZOTTO, C.; BELLICANTA, J. *et al.* Doenças respiratórias como causa de internações hospitalares de pacientes do Sistema Único de Saúde num serviço terciário de clínica médica na região nordeste do Rio Grande do Sul. *Jornal de Pneumologia*. v. 27, n. 4, p. 193-198, 2001.

GOURIET, F.; LEVY, P.-Y.; SAMSON, L. *et al.* Comparison of the new InoDiag automated fluorescence multiplexed antigen microarray to the reference technique in the serodiagnosis of atypical bacterial pneumonia. *Clin Microbiol Infect*. v. 14, p. 1119–1127, 2008.

HAHN, DAVID L. Treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in adult asthma: a before-after trial. *Journal of Family Practice* , 1995.

HAHN, DAVID L. *Chlamydia pneumoniae*, asthma, and COPD: what is the evidence? *Annals of allergy, asthma and immunology*. v. 83, n. 4, p. 271-292, 1999.

HAHN, D. L.; PLANE, M. B.; MAHDI, O. S.; BYRNE, G. I. Secondary Outcomes of a Pilot Randomized Trial of Azithromycin Treatment for Asthma. *PLoS Clin Trials*. v.1, n. 2 e 11, p. 1-8, 2006. Disponível em < <http://www.plosclinicaltrials.org>>. Acesso em: 04 out. 2006.

HAHN, D. L. & PEELING, R. W. Airflow limitation, asthma, and *Chlamydia pneumoniae*-specific heat shock protein 60. *Ann Allergy Asthma Immunol.* v. 101, p. 614–618. 2008.

HAMMERSCHLAG, M. R. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *European Respiratory Journal.* v. 16, p. 1001-1007, 2000.

HAMMERSCHLAG, M. R. Current Status of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*. *Clinical Microbiology Newsletter.* v. 23, n. 14, p. 107-111, 2001.

HAMMERSCHLAG, M. R. Asymptomatic Respiratory Infection With *Chlamydia pneumoniae*. *Chest.* v. 119, p. 1303-1305. 2001

HAMMERSCHLAG, M. R. The Intracellular Life of Chlamydiae. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* v.13, p. 239-248, 2002.

HAMMERSCHLAG, M. R. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: Beyond *Chlamydia trachomatis*. *The Pediatric Infectious Diseases Journal.* v. 26, n. 7, 2007.

HEINEMANN, M.; SUSAN, M.; SIMNACHER, U. *et al.* Growth of *Chlamydia pneumoniae* induces cytokine production and expression of CD14 in human monocytic cell line. *Infection And Immunity.* v. 64, n. 11, p. 4872- 4875, 1996.

HERMANN, C.; GRAF, K.; GROH, A. *et al.* Comparison of Eleven Commercial Tests for *Chlamydia pneumoniae*-Specific Immunoglobulin G in Asymptomatic Healthy Individuals. *Journal of Clinical Microbiology,* Vol. 40, n. 5, p. 1603–1609, 2002.

HERRMANN, C.; GUEINZIUS, K.; OEHME, A. *et al.* Comparison of Quantitative and Semiquantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Immunoglobulin G against *Chlamydomphila pneumoniae* to a Microimmunofluorescence Test for Use with Patients with Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 6, p. 2476–2479, 2004.

HERRMANN, M.; SCHUHMACHER, A.; MÜHLDORFER, I. *et al.* Identification and characterization of secreted effector proteins of *Chlamydomphila pneumoniae* TW183. *Research in Microbiology*. v.6, n.157, p. 513–524, 2006.

HOGAN, R. J.; MATHEWS, S. A.; MUKHOPADHYAY, S. *et al.* MINIREVIEW - Chlamydial Persistence: beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity*. v.72, n. 4, p. 1843–1855, 2004.

HOYMANS, V. Y.; BOSMANS, J. M.; VAN RENTERGHEM, L. *et al.* Importance of methodology in determination of *Chlamydia pneumoniae* seropositivity in healthy subjects and in patients with coronary atherosclerosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 41, n. 9, p. 4049-4053, 2003.

HVIDSTEN, D. ; HALVORSEN, D. S.; BERDAL, B. P. AND GUTTEBERG, T. J. *Chlamydomphila pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clin Microbiol Infect*. v.15, p. 42–49, 2009.

HYBISKE, KEVIN AND STEPHENS, R. S. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* Entry into Nonphagocytic Cells. *Infection and Immunity*. v. 75, p. 3925–3934, 2007.

HYBISKE, KEVIN AND STEPHENS, R. S. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *PNAS*. v. 104, n. 27, 2007.

IJIMA, Y.; MIYASHITA, N.; KISHIMOTO, T. *et al.* Characterization of Chlamydia pneumoniae Species-Specific Proteins Immunodominant in Humans. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 32, n. 3, p. 583 – 588, 1994.

JOHNSTON, S.L.; SANDERSON, G.; PATEMORE, P. K. *et al.* Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 31, n. 1, p. 111-117, 1993.

JOHNSTON, S.L., MARTIN, R. J. *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*: a role in asthma pathogenesis? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 172, p.1078-1089, 2005.

JOHNSTON, S. L.; BLASI F.; BLACK, P. *et al.* The effect of telithromycin in acute exacerbations of asthma. *The New England Journal of Medicine*. v. 354, n.15, p.1589-1600, 2006.

JOHNSTON, N. W.; SEARS, M. R. Asthma exacerbations – 1: epidemiology. Review Series; *Group Ltd & British Thoracic Society*: v.61, n.8, p. 722-728, 2006.

JUVONEN, R.; BLOIGU, A, PALDANIUS, M. *et al.* Acute Chlamydia pneumoniae infections in asthmatic and non-asthmatic military conscripts during a non-epidemic period. *Clinical Microbiology Infectious*, v. 14, p. 207–212, 2008.

KARNAK, D.; BENG-SUN, S. & KAYACAN, O. *Chlamydia pneumoniae* infection and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respiratory Medicine*. v. 95, p. 811-816, 2001.

KARTIKASARI, A. E. R.; GEORGIOU, N. A.; GEEST, M de *et al.* Iron enhances endothelial cell activation in response to Cytomegalovirus or *Chlamydia pneumoniae* infection. *The European Journal of Clinical Investigation*. v.36, p.743–752, 2006.

KERN, J. M.; MAASS, V. AND MAASS, M. Molecular pathogenesis of chronic *Chlamydia pneumoniae* infection: a brief overview. *Clin Microbiol Infect*. v. 15, p. 36–41, 2009.

KING, M. E.; MANNINO, D. M.; HOLGUIN, F. Risk factors for asthma incidence: A review of recent prospective evidence. *Panminerva Medicine*. v. 46, p 97-111, 2004.

KNUDSEN, K.; MADSEN, A. S.; MYGIND, P.; CHRISTIANSEN, G. & BIRKELUND, S. Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infection and Immunity*. v. 67, p. 375-383, 1999.

KOMURA, H.; MATSUSHIMA, H.; OUCHI, K. *et al.* Effects of antiasthma drugs on the growth of *Chlamydomydia pneumoniae* in Hep-2 cells. *J. Infect. Chemother*. v. 9, p. 160-164, 2003.

KOPØIVAA, F.; SZOTKOWSKÁB, J.; ZÁPALKAA, M. Bronchial asthma and *Chlamydia pneumoniae* antibodies in children aged 4–8 years in Olomouc district. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. v.149, n. 2, p. 289–91, 2005.

KUO, C. C. ; JACKSON, L. A. ; CAMPBELL, L. A. ; GRAYSTON, J. T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clinical Microbiology Review*. v. 8, n. 4, p. 451- 460, 1995.

KUMAR, S. & HARMMERSCHLAG, M. R. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: Current status of diagnostic methods. *Clinical Infectious Diseases*. v. 44, n. 15, p. 568-576, 2007.

KUTLIN, A.; ROBLIN, P. M. And HAMMERSCHLAG, M. R. Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *The Journal Infectious Diseases*. v. 177, p. 720-724, 1998.

LAITINEN, K.; LAURILA, A. L.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* Infection in Mice by Cortisone Treatment. *Infection and Immunity*. v. 64, n. 64, p. 1488-1490, 1996.

LANE, B. J.; MUTCHLER, C.; AL KHODOR, S. *et al.* Chlamydial Entry Involves TARP Binding of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *PLoS Pathogens*. v. 4, n. 3, 2008.

LARSEN, F. O.; NORN, S.; MORDHORST, C. H. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* and possible relationship to asthma: serum immunoglobulins and histamine release in patients and controls. *APMIS*. v. 106, P. 928-934, 1998.

LEMANSKE JR.& Robert F. Is Asthma an Infectious Disease? Thomas A. Neff Lecture. *CHEST* v. 123, p. 385-390, 2003.

LIANG, R.; LIU, X.; PEI, D. & LIU, J. Biochemical characterization and functional complementation of ribonuclease H II and ribonuclease H III from *Chlamydomonas reinhardtii* AR39. *Microbiology*. v. 153, p. 787-793, 2007.

LIEBERMAN, D.; LIEBERMAN, D.; PRINTZ, S. *et al.*: Atypicals in Asthma Exacerbation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v.167, p. 406–410, 2003.

LITTMAN, A. J.; JACKSON, L. A.; VAUGHAN, T. L. *Chlamydia pneumoniae* and Lung Cancer: Epidemiologic Evidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. v. 14, n. 4, p. 773-778, 2005.

LIU, R.; MOROI, M.; YAMAMOTO, M. *et al.* Presence and Severity of *Chlamydia pneumoniae* and Cytomegalovirus Infection in Coronary Plaques Are Associated With Acute Coronary Syndromes. *International Heart Journal*. v. 47, n. 4, p. 511-519, 2006

LOENS, K.; BECK, T.; URSI, D. *et al.* Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *Journal of Microbiological Methods*. v.73, p. 257–262, 2008.

LOENS, K.; BECK, T.; URSI, D. *et al.* Development of Real-Time Multiplex Nucleic Acid Sequence-Based Amplification for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Legionella* spp. in Respiratory Specimens_ *Journal of Clinical Microbiology*. v. 46, n. 1, p. 185–191, 2008.

MACDOWELL, Ana L.; BACHARIER, Leonard B. Infectious triggers of asthma. *Immunol Allergy Clinics of North America*. v. 25, p. 45-66, 2005.

MARINO, J.; STOECKLI, I.; WALCH, M. *Chlamydophila pneumoniae* derived from inclusions late in the infectious cycle induce aponecrosis in human aortic endothelial cells. *BMC Microbiology*, v.8, n. 32, 2008

MARRIE, T. J.; PEELING, R.W.; REID, T.; DE CAROLIS, E. and the Canadian Community-Acquired Pneumonia Investigators. *Chlamydia* species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. *European Respiratory Journal*. v. 21, p. 779-784, 2003.

MARTIN, J. Richard. Infections and asthma. *Clinical Chest Medicine*. v. 27, p.87-98, 2006.

MARTINEZ T., M. A.; DIOMEDI P., A.; KOGAN A., Ricardo *et al.* Taxonomía e importancia clínica de las nuevas familias del orden Chlamydiales. *Revista chilena de infectología*. [on-line] v.18, n.3, 2001 Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182001000300007&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0716-1018. Acesso em: 28 agosto 2006.

MÄURER, A. P.; MEHLITZ, A.; MOLLENKOPF, H. J. & MEYER, T. F. Gene expression profiles of *Chlamydophila pneumoniae* during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence. *Plos Pathogens*. v. 3, n. 6, p. 752-769, 2007.

MILLER, Alan L. The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. *Alternative Medicine Review*. v. 6, n. 1, p. 20-47, 2001.

MILLS, G. D.; LINDEMAN, J. A.; FAWCETT, J. P. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* serological status is not associated with asthma in children or young adults. *International Journal of Epidemiology*. v. 29, p. 280-284, 2000.

MIYASHITA, N.; NIKI, Y.; NAKAJIMA, M. Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. *CHEST*. v. 119, p.1416-1419, 2001.

MIYASHITA, N.; FUKANO, H.; OKIMOTO, N. *et al.* Clinical presentation of community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in adults. *CHEST*. v. 121, p. 1776-1781, 2002.

MIYASHITA, N.; FUKANO, H.; YOSHIDA, K. *et al.* Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* in Japan between 1991 and 2000. *Journal of Clinical Pathology* v.55, p.115-117, 2002.

MIYASHITA, N.; FUKANO, H.; YOSHIDA *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection in adult patients with persistent cough. *Journal of Medical Microbiology*. v. 52, p. 265-269, 2003.

MIYASHITA, N.; OBASE, Y.; FUKUDA, M. *et al.* Evaluation of serological tests detecting *Chlamydomydia pneumoniae*-specific immunoglobulin M antibody. *International Medicine*. p. 1127-1131, 2006.

MIYASHITA, N.; OBASE, Y.; FUKUDA, M. *et al.* Evaluation of the diagnostic usefulness of real-time PCR for detection of *Chlamydomydia pneumoniae* in acute respiratory infections. *Journal Infectious Chemotherapy*. v. 13, p. 183-187, 2007.

MIYASHITA, N.; OUCHI, K.; KAWASAKI, K. Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydomydia pneumoniae*. *Respirology*. v. 13, p. 427–431, 2008.

MIYASHITA, N. ; OUCHI,K.; KISHI, F. Rapid and Simple Diagnosis of *Chlamydomydia pneumoniae* Pneumonia by an Immunochromatographic Test for Detection of Immunoglobulin M Antibodies. *Clinical And Vaccine Immunology* v. 15, n.7, p. 1128–1131, 2008.

MOLIN, G. Dal; LONGO, B.; NOT, T. *et al.* A population based seroepidemiological survey of *Chlamydia pneumoniae* infections in school children. *Journal of Clinical Pathology*. v. 58, p. 617-620, 2005.

MONNO, R.; DE VITO, D.; LOSITO, G. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* in community acquired pneumonia: seven years of experience. *Journal of Infection*. v. 45, p. 135-138, 2002.

MOURA, F. E. A. ; BORGES, L. C.; SOUZA, L. S. F. *et al.* Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 39, n. 4, p. 275 – 282, 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; GOOD, D.; MILLER, R. D. *et al.* Identification of *Chlamydia pneumoniae* Proteins in the Transition From Reticulate to Elementary Body Formation. *Molecular & Cellular Proteomics*. v.5 p. 2311-2318, 2006. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/CAPES>>. Acesso em: 24 out. 2006.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; KOBAYASHI, G. S & PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p. 389-397.

NAGY A.; KESZEI, M.; KIS, Z. *et al.* *Chlamydophila pneumoniae* infection status is dependent on the subtypes of asthma and allergy. *Allergy Asthma Proceedings*. v. 28, p. 58-63, 2007.

NORMANN, E.; GNARPE, J.; WETTERGREN, B. *et al.* Association between *Chlamydia pneumoniae* antibodies and wheezing in young children and the influence of sex. *Thorax*. v. 61, p. 1054-1058, 2006.

NUMAZAKI, K. Serological tests *Chlamydia trachomatis* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 228-229, 1998.

OKTEM, I. M. A.; ELLIDOKUZ, H.; SEVINC, C. *et al.* PCR and serology were effective for identifying *Chlamydophila pneumoniae* in a lower infection outbreak among military recruits. *Japanese Journal Infectious Diseases*. v. 60, p. 97-101, 2007.

O'NEILL, C.; MURRAY, L. J.; ONG, G. M. *et al.* Epidemiology of *Chlamydia pneumoniae* infection in randomly selected population in a developed country. *Epidemiology infect.* v. 115, p. 11-16, 1999.

OSTAPCHUK, M.; ROBERTS, D. M. & HADDY, R. Community-acquired pneumonia in infants and children. *American Family Physician*. v. 70, n. 5, p. 899-908, 2004.

ØSTERGAARD, L. & MØLLER, J. K. Use of PCR and Direct Immunofluorescence Microscopy for Confirmation of Results Obtained by Syva MicroTrak *Chlamydia* Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 33, n. 10, p. 2620 – 2623, 1995.

OTOMO, S.; YAMAMURA, J. I.; HAYASHI, E. *et al.* Analysis of children with *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections by real-time PCR assay and serological tests. *APMIS*. v. 116, p. 477–83, 2008.

PALDANIUS, M. Serological studies on *Chlamydia pneumoniae* infections. *Acta Universitatis Ouluensis D Medica* 917. Academic dissertation to be presented, with the assent of the Faculty of Medicine of the University of Oulu, for public defence in the Auditorium of Kastelli Research Centre (Aapistie I), on March 31 st, 2007, Oulu, Finland.

PAPAETIS, G. S.; ANASTASAKOU, E.; TSELOU, T. *et al.* Serological diagnosis of *Chlamydophila pneumoniae* infection in Greek COPD patients by microimmunofluorescence and ELISA. *Med Sci Monit*, v.14, n. 9, p.27-35, 2008.

PARK, S.; LEE, Y.; RHEE, Y.; LEE, H. Seroprevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Stable Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Korean Medical Science*. v. 20, p. 225-228, 2005.

PARTIDGE, M. R. Asthma: 1897-2007. What have we achieved and what are the persisting challenges? *Primary Care Respiratory Journal*. v. 16, n. 3, p. 145-148, 2007.

PASTERNAK, R.; HUHTALA, H.; KARJALAINEN J. *Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae* serology and asthma in adults: a longitudinal analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 116, n. 5, p. 1123-1128, 2005.

PEELING, R. W & BRUNHAM, R. *Chlamydiae* as pathogens: New species and new issues. *Emerging Infectious Diseases*. v. 2, n. 4, p. 307-319, 1996.

PEELING, R. W.; WANG, S.; GRAYSTON, J. T. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* serology: Interlaboratory variation in Microimmunofluorescence assay results. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 181, suppl. 3, p. 426-429, 2000.

PERSSON, K. & BOMAN, J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 7, n. 5, p. 739-744, 2000.

POPSISL, L. & CANDLERLE, J. *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* in animals: a review. *Vet. Med. – Czech*. v. 49, n. 4, p. 129-134, 2004.

PORTIG, I.; GOODALL, J. C.; BAILEY, R. L.; GASTON, J. S. H. Characterization of the Humoral Immune Response to *Chlamydia* Outer Membrane Protein 2 in Chlamydial Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v.10, n. 1, p. 103–107, 2003.

PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S.; BLASI, F. *et al.* Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections. *Clinical Infectious Disease*. p. 1281-1289, 2001.

PRINCIPI, N. & ESPOSITO, S. Emerging role *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. *The Lancet Infectious Diseases*. v. 1, p. 334-344, 2001.

PULJIZ, I.; KUZMAN, I.; DAKOVIC, O. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: comparison of clinical, epidemiological characteristics and laboratory profiles. *Epidemiology Infection*. 2005

RAMIREZ, J. A.; AHKEE, S.; TOLENTINO, A. *et al.* Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. v. 24, p. 7-14, 1996.

RONCHETTI, R.; BISCIONE, G. L.; RONCHETTI, F. *et al.* Why *Chlamydia pneumoniae* is associated with asthma and other chronic condition? Suggestions from a survey in unselected 9 yr old schoolchildren. *Pediatric Allergy and Immunology*. v.16, p.145-150, 2005.

RUGONFALVI-KISS, S.; ENDRÉSZ, V.; MADSEN, H. O. *et al.* Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation*. v. 106, p.1071-1076, 2002.

SANTO, A. H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 22, n. 1, p. 41-52, 2006.

SCHUMACHER, A.; LERKERØD, A. B.; SELJEFLOT, I. *et al.* *Chlamydia pneumoniae* Serology: Importance of Methodology in Patients with Coronary Heart Disease and Healthy Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, V. 39, n. 5, p. 1859–1864, 2001

SASAKI, A.; OUCHI, K.; MAKATA, H. *et al.* The effect of inhaled corticosteroids on *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with bronchial asthma. *J. Infect Chemother*. v. 15, p. 99-103, 2009.

SIDAL, M.; KILIC, A.; UNUVAR, E. *et al.* Frequence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. *Journal of Tropical Pediatrics Advance Access published on May 21, 2007, DOI 10.1093/tropej/fmm003*.

SØREN PEDERSEN. Do Inhaled Corticosteroids Inhibit Growth in Children? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 164, p. 521 –525, 2001.

SUTHERLAND, E. R.& MARTIN, R. J. Asthma and Atypical Bacterial Infection. *CHEST Translating Basic Research Into Clinical Practice*. v. 132, p. 1962–1966 2007.

SWANSON, K. A. CRANE, D. D., AND CALDWELL, H. D. *Chlamydia trachomatis* Species-Specific Induction of Ezrin Tyrosine Phosphorylation Functions in Pathogen Entry_ *infection and immunity*, v. 75, n. 12, p. 5669–5677, 2007.

TEIG, N.; ANDERS, A.; SCHIMIDT, C. *et al.* *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in respiratory specimens of children with chronic lung diseases. *Thorax*. v. 60, p. 962-966, 2005.

TOLEDO, E. Doença da via aérea única. *Arquivos de Ciências e Saúde*. v.11, n. 1, p. 48-52, 2004.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *Expert Panel Report II: guidelines for the diagnosis and management of asthma*. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, 1997.

VANDAHL, B. B.; PEDERSEN, A. S.; GEVAERT, K. *et al.* The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiology*. v. 2, n.36, p. 1-12, 2002.

von HERTZEN, L. Role of persistent infection in the control and severity of asthma: focus on *Chlamydia pneumoniae*. *European Respiratory Journal*. v.19, p.546-56, 2002.

WANG, S. P. The microimmunofluorescence test for *Chlamydia pneumoniae* infections: Technique and interpretation. *Journal of Infectious Diseases*. v. 181, suppl. 3, p. 421-425, 2000.

WANGROONGSARB, P.; GEENKAJORN, K.; PEKTKANCHANAPONG, W. *et al.* *Chlamydophila pneumoniae* infection among young children with respiratory diseases in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. v. 56, p. 146-150, 2003.

WARK, P. A.; JOHNSTON, S. L.; SIMPSON, J. L.; HENSLEY, M. J.; GIBBON, P. G. *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin A reactivation and airway inflammation in acute asthma. *European Respiratory Journal*. v. 20, p. 834–840, 2002.

WARK, P. A. B.; JOHNSTON, S. L.; BUCCHIERI, F. *et al.* Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with Rhinovirus. *The Journal of Experimental Medicine*. v. 201, n. 6, p. 937–947, 2005.

WAZIR, S.; KUMAR, L.; SETHI, S.; SHARMA, M. Seroprevalence of *Chlamydia pneumoniae* in asthmatic children. *Indian Pediatrics*. v. 44, p. 133-136, 2007.

WEBLEY, W. C.; SALVA, P. S.; ANDRZEJEWSKI, C. *et al.* The bronchial lavage of pediatric patients with asthma contains infectious Chlamydia. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. v. 171, p.1083-1088, 2005.

WEBLEY, W.C ; TILAHUN, Y. ; LAY, K. *et al.* Occurrence of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory infections. *Eur Respir J*, v. 33, p. 360–367, 2009.

WEINBERGER, Miles. Respiratory infections and asthma: current treatment strategies review research focus. *DDT*. v. 9, p. 831-837, 2004.

WELLINGHAUSEN, N.; STRAUBE, E.; FREIDANK, H. *et al.* Low prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia. *International Journal of Medical Microbiology*. v. 296, p. 485-491, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Consultation on the development of a comprehensive approach for the prevention and control of chronic respiratory diseases. Geneva, Switzerland, January 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Healthy Environments for Children – Initiating an Alliance for Action. Geneva, Switzerland, 2002.

WOLF, J. AND DALEY, A. J. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. *Paediatric Respiratory Reviews*. v. 8, p. 212–220, 2007.

YAN, Y.; KASSINEN, S. S.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P. Methodological aspects affecting the infectivity of *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures in vitro. *Journal of Microbiological Methods*. v. 61, p. 127-130, 2005.

Anexo 1

Termo de consentimento livre e esclarecido para participar de estudo de pesquisa clínica

Título do Projeto: Prevalência da infecção por *Chlamydophila pneumoniae* em crianças asmáticas e sua relação com a asma.

Pesquisador: Jairo Reis - Pesquisador do Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares.

Introdução: Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda as explicações que serão apresentadas, esclarecendo o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

Objetivo: Investigar a existência de infecção pela bactéria *C. pneumoniae* em crianças e pesquisar se há uma relação com a asma.

Resumo: Grande parte da população mundial tem infecção pela bactéria *C. pneumoniae* e esta infecção pode causar ou agravar doenças do sistema respiratório, como a asma. A infecção pode tornar-se crônica se não for tratada adequadamente. Estudar a presença desta infecção entre as crianças permitirá compreender melhor as doenças associadas à infecção e, talvez, ajudar no tratamento e prevenção.

Procedimento: Se o seu filho tem sintomas de doença respiratória e, além disso, você concorda com a participação dele no estudo, ele pode ser selecionado. A criança deverá ter entre 4 e 15 anos de idade e o consentimento será dado pelos pais ou responsáveis. Havendo concordância, será coletado material da nasofaringe da criança, utilizando um *swab* (cotonete) fino introduzido na cavidade

nasal. Um volume de 3,0 mL de sangue total também será coletado, utilizando material esterilizado e descartável. Seu filho continuará sendo acompanhado pelo seu médico e mesmo que ele desista de permanecer no estudo, o seu tratamento será mantido sem interrupção. Todos os resultados de exames estarão à sua disposição a qualquer momento. Não haverá nenhum custo se seu filho for incluído no estudo, da mesma forma que você não receberá qualquer remuneração pela participação.

Desconfortos: o desconforto causado pela introdução do *swab* nasal é mínimo, podendo ocorrer alguns espirros com pequena irritação no local. A punção venosa para a colheita do sangue também causa um desconforto mínimo, pois se trata de um procedimento rápido, seguro e com pouca dor local, podendo a pele ficar levemente roxa no local da punção.

Benefícios: A sua participação será muito importante para o conhecimento médico da infecção pela bactéria *C. pneumoniae* e poderá contribuir, no futuro, para a melhoria do controle desta infecção em nosso país.

Sigilo: Os seus dados serão mantidos em sigilo até onde é permitido pela lei. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG poderá verificá-los. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o órgão financiador, para a instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG.

Desligamento: Seu filho poderá se afastar a qualquer momento sem prejuízo para o seu acompanhamento médico. O seu médico poderá finalizar a sua participação neste estudo em qualquer ocasião sem prejuízo para o seu acompanhamento.

Novas descobertas: Todos os novos dados desta pesquisa serão fornecidos a você.

Contato com o pesquisador: Poderá ser feito com a prof^a. D^{ra}. Fátima Noroni coordenadora do projeto, pelo telefone (031) 3409-2756 e Jairo Reis, pesquisador pelos números 31 3409-9607 ou 31 9806-3644. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você deverá ligar para o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – COEP/UFMG no número (031) 3409-4592.

Consentimento: Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para que o meu filho participe do estudo, até que eu decida o contrário. Recebe uma cópia assinada deste consentimento.

Nome do paciente selecionado e idade

Assinatura do responsável

Data

Assinatura de testemunha

Data

Assinatura do médico

Data

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Caso nº ☐ ☐ ☐

Data de inclusão: ____/____/____

Nome do paciente: _____

Sexo: _____ Idade: _____

Peso: _____ Altura: _____

Naturalidade: Estado: _____ Cidade: _____

Não brasileiro: País: _____

Procedência: Estado: _____ Cidade: _____ Bairro: _____

Zona rural ou urbana (R ou U):

Endereço: _____

Escolaridade: _____

Características da moradia: _____

Nº de pessoas: _____

Nº de crianças: _____

Nº de cômodos: _____

Possui:

Telefone (S ou N): Quantidade: _____

Televisão (S ou N): Quantidade: _____

Carro (S ou N): Quantidade: _____

Renda familiar em salários mínimos: _____

Doenças pré-existentes (S ou N):

Se sim, qual(is): _____

Motivo do atendimento: _____

Encaminhado para exames diagnósticos (S ou N):

Se sim, quais: _____

Obs: anexar resultados.

Diagnóstico: _____

Utilizou corticóides e/ou antibióticos nos últimos 30 dias (S ou N): Se sim, qual e

duração do tratamento: _____

Se portador de doença respiratória anterior, já foi submetido a tratamento (S ou N):

Se sim, qual e tempo de duração: _____.

Se portador de asma qual a frequência de episódios: _____.

Médico Responsável pelo atendimento:

Parecer nº. ETIC 0057/06

Interessada: Profa. Fátima Soares Motta Noronha
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, *ad referendum*, no dia 11 de setembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Prevalência da infecção por *Chlamydomphila pneumoniae* em crianças e sua relação com a asma"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

(2ª via)

Decisão/Adendo nº. ETIC 057/06

Interessado(a): Profa. Fátima Soares Motta Noronha
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO/ADENDO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de novembro de 2007, o pedido de adendo do projeto intitulado **"Prevalência da infecção por *Chlamydomphila pneumoniae* em crianças e sua relação com a asma"** bem como o novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG