

PNEUMONIA INFANTIL POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*:
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO ESPECÍFICO*

Heloisa Helena B. MELLES**
Sílvia COLOMBO**
Bernardo EJZEMBERG***

RIALA6/644

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; EJZEMBERG, B. — Pneumonia infantil por *Chlamydia trachomatis*: diagnóstico sorológico específico. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 48(1/2):57-62, 1988.

RESUMO: No período de março de 1985 a março de 1988, soros de 125 crianças com quadro clínico de infecção pulmonar foram submetidas a exame sorológico para pesquisa de anticorpos para *Chlamydia trachomatis* pela reação de imunofluorescência indireta; 18 soros (14,4%) foram positivos com título de anticorpos $IgM \geq 1:32$. Se considerarmos apenas aquelas crianças com pneumonia intersticial, i.e. 80 crianças, 17 (21,3%) foram positivas. Somente uma (2,5%) das 45 crianças sem quadro de pneumonia apresentou título de anticorpos $IgM \geq 1:32$. Analisou-se a sensibilidade e especificidade da reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anticlamídia em casos de pneumonia.

DESCRIPTORIOS: pneumonia, *Chlamydia trachomatis*; clamídia, diagnóstico sorológico.

INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis*, segundo os conhecimentos atuais, é um patógeno especificamente humano, sendo agente etiológico do tracoma, conjuntivite de inclusão, infecções do trato urinário e genital, linfogranuloma venéreo, pneumonia infantil, miocardite aguda, síndrome de Reiter e, supostamente, de infecções do trato gastrointestinal.

A infecção por *C. trachomatis* no recém-nascido é transmitida através do canal cervical infectado da mãe para seu filho no momento do parto. Alguns estudos revelam que a prevalência da infecção da cervix em grávidas varia de 5 a 13%¹³. Duas manifestações clínicas mais importantes são decorrentes, para a criança, desta exposição materno-fetal: a ocorrência de conjuntivite purulenta denominada conjuntivite de inclusão do recém-nascido e de pneumonia^{1,18}.

A incidência da infecção perinatal está estimada em cerca de 33 a 50%⁹ e é decorrente da existência de infecção na cervix uterina da mulher grávida.

A pneumonia infantil geralmente ocorre entre 3 a 16 semanas de idade. O quadro pulmonar se apresenta sob a forma de pneumonia afebril com taquipnéia, e o quadro radiológico apresenta infiltrado do tipo intersticial bilateral e simétrico. Embora o quadro de pneumonia por *C. trachomatis* tenha sinais e sintomas distintos das outras pneumonias, o diagnóstico etiológico de certeza deverá basear-se no isolamento da clamídia do trato respiratório inferior ou no estudo da resposta sorológica específica. Aproximadamente 60 a 70% das crianças expostas desenvolvem evidências sorológicas desta infecção^{1,13}.

Por haver infecção nasofaríngea sem que haja comprometimento pulmonar^{1,18}, a amostra

* Realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, S.P.

ideal para isolamento do agente etiológico da pneumonia infantil seria a obtida por métodos invasivos, o que raramente é possível.

Schachter et al.¹³ sugerem que a presença de anticorpos da classe IgM específicos para *C. trachomatis* em título igual ou maior que 1:32 em uma única amostra de soro seria o método mais conveniente para o diagnóstico de pneumonia por esse agente em recém-nascidos. Esta determinação pode ser feita pela imunofluorescência indireta usando como antígeno uma amostra de clamídia, ou também pela microimunofluorescência simplificada¹⁹ ou por ensaio imunoenzimático (EIE)⁶.

Considerando que crianças com pneumonia por *C. trachomatis* apresentam alto título de anticorpos IgM específicos para esta infecção e que na literatura nacional especializada nada encontramos a esse respeito, planejamos fazer um estudo sorológico em crianças hospitalizadas apresentando quadro pulmonar.

Neste trabalho, apresentamos os resultados sorológicos obtidos, sua interpretação e implicações relacionadas com os achados no exterior sobre o assunto.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudadas 125 crianças de menos de duas até 32 semanas de idade e que apresentavam algum tipo de patologia pulmonar, estando internadas em clínicas pediátricas de Hospitais Gerais da cidade de São Paulo no período de março de 1985 a março de 1988. Foram divididas clinicamente em três grupos: 1º) 80 crianças que apresentavam quadro de pneumonia intersticial com características da infecção por *C. trachomatis*; 2º) 40 crianças com alguma pneumopatia apresentando sinais de insuficiência respiratória ou de bronquiolite, etc; 3º) 5 crianças com quadro respiratório, porém, com infecção em outros aparelhos. Foi colhida amostra de sangue por punção venosa, e os soros, após separação, foram mantidos a -20°C até a determinação do título de anticorpos IgM e IgG específicos para *C. trachomatis*.

A metodologia empregada foi a reação de imunofluorescência indireta, utilizando como antígeno as inclusões produzidas pela amostra L₂ da *C. trachomatis* em cultura de células contínuas denominadas McCoy, tratadas com cycloheximida^{8,10}, com algumas modificações. As células McCoy infectadas com a amostra L₂ foram tratadas com tripsina/versene e lavadas uma vez com solução balanceada de Hanks e outra com solução tamponada de fosfato (PBS) de pH7,2 através de centrifugação em baixa rotação (750 rpm/min.). Em seguida, as

células foram re-suspensas em PBS pH7,2 de modo a obter-se número de células pré-estabelecido¹⁶. Foram colocados 10 µl dessa suspensão em cada orifício de lâminas próprias para imunofluorescência e deixadas secar à temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas em acetona por 10 min. a 4°C, e em seguida foram novamente deixadas secar à temperatura ambiente e estocadas a -70°C.

O teste para detecção dos anticorpos consistiu em diluições seriadas dos soros partindo de 1:8 até 1:64 para os anticorpos da classe IgG e de 1:8 até 1:32 para os anticorpos da classe IgM. Foi colocada uma gota de cada diluição do soro em orifício de duas lâminas previamente com antígeno, nas quais, após período de incubação de 30 min. a 37°C, foram colocados anticorpos específicos para IgG e IgM respectivamente, conjugados à fluoresceína. Para cada anticorpo marcado (anti-IgG e anti-IgM) foram feitos controles com soros conhecidamente positivo e negativo, assim como foram feitos controles de células não inoculadas. A leitura da reação foi feita após 30 min. de incubação a 37°C. O título final da reação foi tomado como a maior diluição do soro que revelasse intensidade de fluorescência igual ou maior que duas cruzes (+ +).

Para facilitar a avaliação futura dos resultados da IF, foram considerados os seguintes critérios: a) *positivo*: quando o título dos anticorpos IgM fosse igual ou maior que 1:32; b) *sugestivo*: quando o título de anticorpos IgM fosse inferior a 1:32, ou então quando o título de IgG fosse alto, isto é, igual ou maior que 1:64 e o IgM fosse igual ou menor que 1:16; c) *negativo*: quando o título de IgM fosse igual a 1:8 ou não fosse detectado qualquer título.

Como o fator reumatóide interfere particularmente nas pesquisas de IgM, ficou assentado que todos os soros positivos para essa classe de imunoglobulina seriam examinados para a presença desse fator pela técnica de aglutinação em lâmina, segundo Singer¹⁷, com reativo adquirido comercialmente.

RESULTADOS

Do total de 125 crianças estudadas, 18 (14,4%) apresentaram reação de IF positiva com título de anticorpos IgM específicos para *C. trachomatis* maior ou igual a 1:32. Dentro dos critérios adotados, estes soros foram considerados positivos para pneumonia causada por esse agente (tabela 1).

Ao considerarmos os resultados sorológicos com a distribuição em três grupos de acordo com a suspeita clínica, obtivemos as seguintes evidências: de 80 crianças do 1º grupo, 17 (21,3%) apresentaram anticorpos IgM ≥ 1:32 (tabela 2), enquanto

TABELA 1

Anticorpos IgM em crianças de 0 a 8 meses de idade com suspeita de infecção por C. trachomatis

Idade: semanas	Anticorpos IgM			Nº pos./Nº test. (%)*
	Positivo	Sugestivo	Negativo	
até 2	—	—	6	0/6 (0,0)
3 — 4	8	1	14	8/23 (34,8)
5 — 8	7	—	39	7/46 (15,2)
9 — 12	1	—	14	1/15 (6,6)
13 — 16	—	—	12	0/12 (0,0)
17 — 20	1	1	10	1/12 (8,3)
21 — 24	—	—	3	0/3 (0,0)
25 — 28	1	—	4	1/5 (20,0)
29 — 32	—	—	3	0/3 (0,0)
Total	18	2	105	18/125 (14,4)

* Porcentagem de positivos.

TABELA 2

Grupo 1: — Sorologia para pacientes com quadro clínico sugestivo de pneumonia intersticial por C. trachomatis

Idade: semanas	Nº soros testados	Anticorpos IgM		
		Positivo	Sugestivo	Negativo
até 2	2	—	—	2
3 — 4	14	8	1	5
5 — 8	31	6	—	25
8 — 12	11	1	—	10
13 — 16	7	—	—	7
17 — 20	8	1	—	7
21 — 24	2	—	—	2
25 — 28	4	1	—	3
29 — 32	1	—	—	—
Total	80	17 (21,3%)*	1	62

* Porcentagem de positivos.

que, de 40 crianças do 2º grupo, apenas uma (2,5%) apresentou esse título de anticorpos IgM (tabela 3). As crianças do 3º grupo, em número de 5, não apresentaram títulos sequer sugestivos de anticorpos IgM da infecção pela clamídia.

Detalhando o resultado do 1º grupo, que é o que mais nos interessa, verificamos que de 80 crianças suspeitas de pneumonia pela *C. trachomatis*, 17 (21,3%) tiveram essa etiologia confirmada pelo exame sorológico específico, isto é, pela

determinação do IgM específico para este agente. Obviamente, houve correlação entre o número de positivos e a suspeita do quadro clínico.

Níveis detectáveis de IgM para esse agente foram mais frequentes na faixa etária de 3 a 8 semanas.

Das 125 crianças estudadas, 23 (18,4%) apresentaram título de anticorpos IgG específicos para *C. trachomatis* igual ou superior a 1:64 (tabela 4).

TABELA 3

Grupo 2 — Sorologia para pacientes com pneumopatia não sugestiva de infecção por clamídia.

Idade: semanas	Nº soros testados	Anticorpos IgM		
		Positivo	Sugestivo	Negativo
até 2	4	—	—	4
3 — 4	8	1	—	7
5 — 8	13	—	—	13
9 — 12	4	—	—	4
13 — 16	3	—	—	3
17 — 20	4	—	1	3
21 — 24	1	—	—	1
25 — 28	1	—	—	1
29 — 32	2	—	—	2
Total	40	1 (2,5%)*	1	38

* Porcentagem de positivos.

TABELA 4

Anticorpos IgG específicos para *C. trachomatis* no soro de 125 crianças

Idade: semanas	Nº soros testados	Título de anticorpos IgG			
		<16*	16	32	≥64
até 2	9	5	—	1	3
3 — 4	23	12	1	2	8
5 — 8	44	30	4	3	7
9 — 12	15	12	2	—	1
13 — 16	12	10	1	—	1
17 — 20	12	9	—	1	2
21 — 24	3	3	—	—	—
25 — 28	5	3	—	1	1
29 — 32	2	1	1	—	—
Total	125	85	9	8	23 (18,4%)

* Números indicam inverso da diluição.

Destas crianças, 17 (78,2%) apresentaram títulos de IgM ≥ 1:32, isto é, positivos para a infecção estudada. Dentre as outras 5 crianças que apresentaram IgG em altos títulos (≥ 1:64) mas com IgM negativo, 3 tinham menos de duas semanas de idade, com quadro de conjuntivite. Para 2 dessas 3 crianças foi efetuada a reação de imunofluorescência direta com anticorpo monoclonal marcado com fluoresceína para *C. trachomatis* em esfregaço de secreção conjuntival e em ambos os casos os resultados foram positivos. As outras duas crianças tinham entre 2 e 4 meses de idade, sendo que a primeira apresentava quadro de bronquiolite. Obviamente, os anticorpos presentes eram de origem materna.

Outro resultado de interesse foi o obtido em relação ao fator reumatóide. Nenhum soro IgM positivo para *C. trachomatis* resultou positivo nesta prova. Assim sendo, podemos asseverar que o fator reumatóide não interferiu na reação de imunofluorescência e portanto, nos resultados da pesquisa de IgM específico para *C. trachomatis*.

DISCUSSÃO

O diagnóstico sorológico de pneumonia pela *C. trachomatis* pode apresentar algumas dificuldades. O recém-nascido poderá apresentar anticorpos maternos IgG em títulos algumas vezes muito altos,

adquiridos passivamente da mãe. Considerando que somente os anticorpos IgG atravessam a placenta, obviamente, os anticorpos IgM (e IgA) presentes no soro do recém-nascido deverão indicar infecção em atividade na criança. Por vezes, a resposta em anticorpos na criança só poderá ser detectada em níveis muito baixos, porém, mesmo que este fato ocorra, ainda é preferível optar pelo exame sorológico que o isolamento do agente, posto que o cultivo e identificação da *C. trachomatis* levarão cerca de 3 a 6 dias para complementação. Ademais, tem sido demonstrado que melhores resultados para isolamento do agente somente são obtidos quando se dispõe de amostras de secreção do trato respiratório inferior, cuja obtenção em crianças nem sempre é possível⁵. Alguns autores^{1,16} verificaram que são comuns infecções persistentes e clinicamente inaparentes, como consequência da conjuntivite de inclusão. Desse modo, o isolamento da clamídia ou a detecção do agente pela IF direta usando anticorpo monoclonal marcado com fluoresceína a partir de secreções do trato respiratório superior, não teria valor diagnóstico de pneumonia. Resulta que o método sorológico é o de escolha para diagnóstico da pneumonia por clamídia em recém-nascidos.

Em relação à sensibilidade do método usado neste trabalho, temos a comentar que são poucos os trabalhos existentes na literatura sobre comparação dos métodos sorológicos para diagnóstico de clamídia. Entretanto, os autores que compararam seus resultados usando IF e EIE (realizado com antígeno proteico da cepa L₂ da *C. trachomatis*) asseguram que a sensibilidade do método da IF está perto de 100%, isto é, são praticamente iguais aos do EIE⁶, tanto para detectar IgM como IgG. Ainda em relação à sensibilidade do método, deve ser lembrado que em duas crianças o raspado conjuntival pela IF direta foi positivo para *C. trachomatis* e elas apresentaram anticorpos da classe IgG em altos títulos ($\geq 1:64$) e anticorpos IgM negativos. Neste sentido, obviamente, os anticorpos eram maternos. Deve ser destacado, no entanto, que Schachter et al.¹² referem a experiência de que em conjuntivite por clamídia em recém-nascidos, o anticorpo IgM específico para esse agente não é detectado e, nos raros casos em que aparece, seus títulos são baixos. Portanto, a sorologia para conjuntivite causada pela *C. trachomatis* não ajuda o diagnóstico clínico, restando o isolamento do agente e a IF direta em esfregaços conjuntivais como metodologia indicada para o diagnóstico etiológico da infecção localizada⁷.

Quanto à especificidade da reação usada no trabalho, podemos sem dúvida classificá-la como boa, posto que as reações consideradas falso-positivas foram eliminadas em parte com a realização da prova para o fator reumatóide. Reações cruzadas dando resultados falso-positivos (que podem ocorrer com o chamado complexo C dos sorotipos da *C. trachomatis*) não ocorreram, porque a presença ou

aumento de anticorpos IgM foi sempre acompanhada da presença ou aumento do anticorpo IgG. A ausência de anticorpos IgG na presença de anticorpos IgM não ocorreu em nenhum soro positivo para IgM específico para *C. trachomatis* em nosso trabalho. Outro agente, denominado IOL-207⁴, reconhecido como sendo uma clamídia atípica que revela reações sorológicas cruzadas com a *C. trachomatis*, foi desconsiderado em nosso trabalho, porque, do ponto-de-vista soropidemiológico, este agente atípico só foi detectado na população em crianças acima de 5 anos de idade³, afastando assim qualquer possibilidade de ter influido em nossos resultados. Deve ser levado em consideração que 1% da população¹³ apresenta IgM específico para *C. trachomatis* com títulos iguais ou maiores que 1:32 quando padecem de infecção sistêmica por esta clamídia, representando em consequência, resultado falso-positivo para o diagnóstico de pneumonia infantil por *C. trachomatis*. Devido a esta razão, a especificidade do diagnóstico sorológico de pneumonia pela detecção de IgM específico para esta clamídia, está perto de 100%.

Nosso trabalho mostrou que 21,3% das crianças recém-nascidas suspeitas de pneumonia por clamídia realmente padeciam de pneumonia causada pela *C. trachomatis*. Este achado é compatível com os achados de outros autores como Schachter et al.¹⁴ em 1986, em São Francisco nos Estados Unidos, que em estudo prospectivo durante 5 anos, detectaram 16% de pneumonia por esse agente em crianças com quadro clínico suspeito; e Siritantikom et al.¹⁵, na Tailândia, que, embora com menor número de casos estudados, encontraram positividade para *C. trachomatis* em 3 dentre 10 recém-nascidos com pneumonia intersticial.

Generalizando, os autores citam que 11 a 20% das crianças nascidas através da cervix uterina infectada, desenvolvem pneumonia pela *C. trachomatis*³, sendo também importante ressaltar que aproximadamente 30 a 50% das pneumonias que ocorrem nos primeiros seis meses de vida são causadas pela *C. trachomatis*^{9,18}.

Não há dados na literatura nacional para qualquer tipo de projeção destas infecções em nosso país. Entretanto, a projeção feita por Schachter et al.¹⁴ nos Estados Unidos, revela que, tomando por base 3,5 milhões de nascimentos anuais naquele país, são previstos aproximadamente 26.000 casos de pneumonia e 29.000 casos de conjuntivite por ano. A partir desses dados, esses autores inferem que a infecção pela *C. trachomatis* é, possivelmente, a infecção perinatal mais comum.

Agradecimentos

Ao Dr. Luis Florêncio de Salles Gomes, pela colaboração e sugestões recebidas na redação deste trabalho.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; EJZEMBERG, B. — Infantile pneumonia by *Chlamydia trachomatis*: specific serological diagnose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2):57-62, 1988.

ABSTRACT: Sera from 125 children with clinical manifestations of lung infection were tested for antibodies to *Chlamydia trachomatis* by indirect immunofluorescence test; 18 (14.4%) were positives for IgM antibodies (titer \geq 1:32). However if we consider only those children with interstitial pneumonia i.e. 80 children, 17 (21.3%) were positives. Only one (2.5%) out of 45 children with nonpneumonic conditions (bronchiolitis) was positive for IgM antibodies (titer \geq 1:32). Sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence test for chlamydia antibodies in pneumonia cases are discussed.

DESCRIPTORS: pneumonia, *Chlamydia trachomatis*, serology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEEM, M.O. & SAXON, E.M. — Respiratory-tract colonization and a distinctive pneumonia syndrome in infants infected with *Chlamydia trachomatis*. *N. Engl. J. Med.* 296(6):306-310, 1977.
2. BLACK, S.; GROSSMAN, M.; CEES, L.; SCHACHTER, J. — Serologic evidence of chlamydial infection in children. *J. Ped.* 98:65-67, 1981.
3. BURNEY, P.; FORSEY, T.; DAROUGAR, S.; SITTAMPALAM, Y.; BOOTH, P.; CHAMBERLAIN, R. — The epidemiology of chlamydial infections in childhood: a serological investigation. *Int. J. Epidemiol.* 13(4):491-495, 1984.
4. DURYER, R. StC.; TREHARNE, J.D.; JONES, B.R.; HERRING, J. — Chlamydial infection—results of micro-immunofluorescence tests for the detection of type-specific antibody in certain chlamydial infections. *Br. J. Vener. Dis.* 48:452-459, 1972.
5. HARRISON, H.R.; ENGLISH, M.G.; LEE, C.K.; ALEXANDER, E.R. — *Chlamydia trachomatis* infant pneumonitis, compared with matched controls and other infant pneumonitis. *N. Engl. J. Med.* 298:702-708, 1978.
6. PUOCLAKKAINEN, M.; SAIKKU, P.; LEINONEN, M.; NURMINEN, M.; VAANANEN P.; MAKELA, P.H. — Chlamydial pneumonitis and its serodiagnosis in infants. *J. Infect. Dis.* 149(4):598-604, 1984.
7. RAPOZA, P.A.; QUINN, T.C.; KISSLING, L.C.; GREEN, W.R.; TAYLOR, H.R. — Assessment of neonatal conjunctivitis with a direct immunofluorescent monoclonal antibody stain for chlamydia. *JAMA* 255(24):3369-3373, 1986.
8. RICHMOND, S. & CAUL, E.O. — Fluorescent antibodies studies in chlamydial infections. *J. Clin. Microbiol.* 1(4):345-32, 1975.
9. RIVERA, L.; RODRIGUEZ, J.; GORBEA, H.F.; HERNANDEZ, N.; CHRISTENSON, B.; RAMIREZ-RONDA, C.H. — Chlamydial pneumonia: a review. *Bolet. Assoc. Méd. P. Rico* 76(2):52-55, 1984.
10. SAIKKU, P. & PAAVONEN, J. — Single-antigen immunofluorescence test for chlamydial antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 8(2):119-122, 1978.
11. SCHACHTER, J.; GROSSMAN, M.; HOLT, Y.; SWEET, R.; GOODNER, E.; MILLIS J. — Prospective study of chlamydial infection in neonates. *Lancet* 2:377-380, 1979.
12. SCHACHTER, J.; GROSSMAN, M.; HOLT, R.S.; SPECTOR, S. — Infection with *Chlamydia trachomatis*: involvement of multiple sites in neonates. *J. Infect. Dis.* 139(2):232-234, 1979.
13. SCHACHTER, J.; GROSSMAN, M.; AZINI, P.H. — Serology of *Chlamydia trachomatis* in infants. *J. Infect. Dis.* 146(4):530-535, 1982.
14. SCHACHTER, J.; GROSSMAN, M.; SWEET, R.L.; HOLT, R.S.; JORDAN, C.; BISHOP, E. — Prospective study of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis*. *JAMA* 255(24):3374-3377, 1986.
15. SIRITANTIKOM, S.; KANTANG, R.; PUTHAVATHANA, P.; CHAVALIDDHAWRONG, P.; BOONYAPRAKOB, U.; WASI, C.; THONGCHAROEN, P. — *Chlamydia trachomatis* infection in newborns. *J. Med. Assoc. Thai.* 69(6):312-317, 1986.
16. SMITH, T.F.; BROWN, S.D.; WEED, L.A. — Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by cell cultures and serology. *Lab. Med.* 13(2):92-100, 1982.
17. SINGER, J.M. & PLOTZ, C.M. — The latex fixation test. I. Application of the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* 21(6):888-892, 1956.
18. TIPPLE, M.A.; BEEM, M.O.; SAXON, E.M. — Clinical characteristics of the afebrile pneumonia associated with *Chlamydia trachomatis* infection in infants less than 6 months of age. *Pediatrics* 63:192-197, 1979.
19. WANG, S.P.; GRAYSTON, J.T.; ALEXANDER, E.R.; HOLMES, K.K. — Simplified micro-immunofluorescence test with trachomalymphogranuloma venereum (*Chlamydia trachomatis*) antigens for use as a screening test for antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1:250-5, 1975.

Recebido para publicação em 7 de junho de 1988.