

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis e  
gestantes assintomáticas**

**Deborah Beltrami Gomez**

Porto Alegre

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis e gestantes assintomáticas**

**Deborah Beltrami Gomez**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Beltrami Gomez, Deborah  
Prevalência de Chlamydia trachomatis em mulheres  
inférteis e gestantes assintomáticas / Deborah  
Beltrami Gomez. -- 2016.  
81 f.  
Orientador: Eduardo Pandolfi Passos.  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.  
1. Chlamydia trachomatis. 2. Prevalência. 3.  
Reação em Cadeia da Polimerase. 4.  
Imunofluorescência. 5. Infertilidade feminina. I.  
Pandolfi Passos, Eduardo, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos, por todas as oportunidades que me proporcionou, pelos ensinamentos e incentivo constantes e pela confiança na minha competência.

Ao serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter me acolhido e contribuído integralmente para minha formação de especialista.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia da UFRGS, pelo incentivo ao meu desenvolvimento científico.

À equipe de pesquisadoras do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela indispensável colaboração na execução desse projeto.

Ao meu noivo, Guilherme Rezende Baade, pela colaboração direta na realização desse trabalho e, principalmente, pelo companheirismo, compreensão e palavras de consolo e estímulo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, especialmente ao Ivan Sereno Montenegro, pela ajuda direta e indireta que me ofereceram.

Aos meus pais, padrasto e irmãs, pelo apoio, amor, incentivo, educação e valores éticos e morais.

Muito obrigada.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO DA LITERATURA.....	10
1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	10
2 Marco conceitual esquemático.....	14
3 A biologia da <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	14
4 A imunopatologia da <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	17
5 Manifestação clínica da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	19
5.1 Infecção urogenital.....	19
5.2 Outros tipos de infecção por CT .....	22
5.3 Infecção por CT e gestação.....	23
6 Diagnóstico da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	25
6.1 Giemsa.....	25
6.2 Cultura.....	25
6.3 Detecção de antígenos.....	27
6.4 Detecção de anticorpos.....	28
6.5 Captura híbrida.....	31
6.6 Testes de amplificação de ácidos nucleicos.....	31
6.7 Testes rápidos.....	35
7 Tratamento da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	35
8 Rastreamento da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	36
9 Epidemiologia da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	37
JUSTIFICATIVA .....	42
HIPÓTESES .....	42
OBJETIVOS.....	43
REFERÊNCIAS .....	44
ARTIGO.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73
PERSPECTIVAS.....	74
ANEXOS.....	75
Anexo 1 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) investigação de infertilidade.....	75
Anexo 2 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) gestantes.....	77
Anexo 3 Instrumento de Pesquisa.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

‰: por cento

µm: micrômetro

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

A-T: Adenina e Timina

ATP: Adenosina Trifosfato

BGMK: *buffalo green monkey kidney*

bp: pares de bases

CD4: *cluster of differentiation 4*

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CE: Corpos elementares

CHSP60: proteína de choque térmico 60 da *C. trachomatis*

CR: Corpos reticulares

CT: *Chlamydia trachomatis*

DeCS: Descritores em Ciências da Saúde

DIP: Doença Inflamatória Pélvica

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNTP: desoxirribonucleotideo fosfatado

DST: doença sexualmente transmissível

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

EIA: ensaio imunoenzimático

ELISA: *enzyme linked immunoassay*

g: gramas

Hela: *Henrietta Lacks*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPS: proteína de choque térmico

HPV: Papilomavírus Humano

IC: intervalo de confiança

IFD: imunofluorescência direta

IFI: imunofluorescência indireta

IFN-  $\alpha$ : interferon alfa

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IgA: imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL: interleucina

LPS: lipopolissacarídeos

LT: linfócito T

MeSH: *Medical Subject Headings*

mg: miligramas

MIF: microimunofluorescência

MOMP: *major outer membrane protein*

NAAT: Teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos

NK: *Natural killers*

nvCT: nova variante da *Chlamydia trachomatis*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: PCR em tempo real

RNA: Ácido Ribonucléico

rRNA: RNA ribossômico

SDA: amplificação de deslocamento

Th: *T helper*

TLR: receptores tipo Toll

TMA: amplificação mediada por transcrição

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TPP: trabalho de parto prematuro



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, Scielo e CAPES através de MeSH .....11

Tabela 2 - Resultado do cruzamento de busca de referências bibliográficas na base de dados PubMed.....12

Tabela 3 - Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, Scielo e CAPES através de DeCS.....13

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - História natural e sequelas da infecção por clamídia em mulheres.....14

## RESUMO

**Introdução:** A infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis* é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais prevalente no mundo e afeta principalmente mulheres jovens sexualmente ativas. Infecções não tratadas podem provocar complicações reprodutivas decorrentes do dano tubáreo. Na gestação, aumenta o risco de parto prematuro, baixo peso ao nascer, morte perinatal, conjuntivite e pneumonia neonatal. Existem poucos dados brasileiros referentes à epidemiologia dessa infecção no nosso meio. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência de *C. trachomatis* em mulheres inférteis e em gestantes.

**Método:** Foram analisadas transversalmente 77 mulheres inférteis e 60 gestantes assintomáticas. Foram coletadas amostras urinárias para ensaio de PCR e amostras sanguíneas para pesquisa de anticorpos IgG através da técnica de imunofluorescência indireta. Todas as participantes responderam um questionário referente ao seu histórico clínico e ginecológico.

**Resultados:** A prevalência, tanto no ensaio de PCR quanto na imunofluorescência indireta (IgG) para *C. trachomatis* foi similar entre os grupos. Encontramos anticorpos IgG presentes em 61% das mulheres inférteis e em 56,7% das gestantes. Houve somente 1 PCR positivo no grupo das inférteis (1,3%) e nenhum do grupo das gestantes.

**Conclusão:** Encontramos alta prevalência de anticorpos IgG para *C. trachomatis* em mulheres inférteis e em gestantes, mas verificamos baixa prevalência de PCR positivo nas participantes. A presença de IgG correlacionou-se com comportamento sexual e tabagismo.

**Palavras-chave:** *Chlamydia trachomatis*; Prevalência; Reação em Cadeia da Polimerase; Infertilidade feminina; Imunofluorescência.

## ABSTRACT

**Background:** *Chlamydia trachomatis* (CT) is the most prevalent sexually transmitted bacterial infection and affects mainly young, sexually active, women. Untreated infection may lead to reproductive complications due to tubal damage. Infections during pregnancy may cause preterm labor, low birth weight, perinatal death and neonatal conjunctivitis and pneumonia. There is little data on CT infection in Brazil. The aim of this study was to determine CT prevalence on infertile and pregnant women.

**Methods:** A cross-sectional study included 77 infertile and 60 asymptomatic pregnant women. First void urine was tested to CT using PCR and blood samples were collected for CT IgG antibodies testing using Indirect Immunofluorescence. A questionnaire about medical, gynecological and sexual history was applied to all participants.

**Results:** We found statistically similar prevalence of PCR and IgG antibodies between groups. This study observed a 61% prevalence of CT IgG antibodies in infertile women and 56,7% in pregnant women. PCR was positive in only one (1,3%) infertile woman and in none of the pregnant.

**Conclusion:** A high prevalence of *C. trachomatis* IgG antibody in Brazilian pregnant and infertile women, but a low prevalence of positive PCR on urine samples were demonstrated. CT antibodies were associated with sexual behavior and smoking.

**Key-words:** *Chlamydia trachomatis*; Prevalence, Nucleic Acid Amplification Techniques; Infertility, female; Fluorescent Antibody Technique.

## INTRODUÇÃO

*Chlamydia trachomatis* (CT) é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais prevalente no mundo. Ela acomete principalmente mulheres jovens e adolescentes sexualmente ativas. A maioria das infecções por CT são assintomáticas ou têm sintomas inespecíficos. Por isso, na ausência de estratégias de rastreamento da população, o diagnóstico geralmente é tardio e ocorre quando as sequelas já se instalaram. Em mulheres, infecções não tratadas podem ocasionar doença inflamatória pélvica (DIP), dor pélvica crônica, infertilidade tuboperitoneal e gravidez ectópica. Em gestantes, aumenta o risco de parto prematuro, baixo peso ao nascer e morte perinatal. Além disso, a transmissão vertical geralmente provoca conjuntivite e/ou pneumonia de inclusão neonatal.

Entre os métodos disponíveis para o diagnóstico, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) são preferíveis, por terem alta sensibilidade e especificidade e por permitirem a análise em amostras não invasivas, como urina e secreção vaginal. Após a infecção, os anticorpos IgG podem persistir por anos, mesmo após terapêutica adequada. Por isso, são marcadores de infecção passada por CT.

No Brasil, como não se recomenda rastreamento rotineiro e, por não se tratar de infecção de notificação compulsória, existem poucos dados referentes à epidemiologia dessa infecção.

O objetivo desse estudo é determinar a prevalência de infecção por CT em mulheres inférteis e gestantes assintomáticas em um hospital no sul do Brasil.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca de referências bibliográficas envolveu as seguintes palavras-chave ou *MeSH terms*: 1) *Chlamydia trachomatis*; 2) *Chlamydia infections*; 3) *Prevalence*; 4) *Nucleic Acid Amplification Techniques*; 5) *Fluorescent Antibody Technique*; 6) *Diagnostic Techniques and Procedures*; 7) *Infertility, female*; 8) *Pregnancy*; 9) *Fallopian Tube Diseases* e 10) *Urine* nas bases de dados PubMed, Scielo e portal CAPES. Os resultados encontrados estão na tabela 1. O cruzamento das palavras-chave na base de dados Pubmed está ilustrado na tabela 2.

Além disso, foram utilizados os seguintes DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) para busca de literatura nacional nas mesmas bases de dados: 1) *Chlamydia trachomatis*; 2) Prevalência; 3) Reação em Cadeia da Polimerase; 4) Imunofluorescência; 5) Diagnóstico; 6) Infertilidade feminina e 7) Gravidez. A tabela 2 demonstra os resultados encontrados.

Os artigos foram selecionados através do título e, posteriormente, pela leitura dos resumos. Foram utilizados artigos com texto completo disponível, nos idiomas inglês, espanhol e português, publicados nos últimos 20 anos.

Adicionalmente, foram selecionadas referências relevantes citadas nos artigos selecionados.

Tabela 1 - Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, Scielo e CAPES através de MeSH

<b>Palavras-chave (MeSH)</b>	<b>Pubmed</b>	<b>Scielo</b>	<b>CAPES</b>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	13.918	172	28.776
<i>Chlamydia infections</i>	23.661	109	21.154
<i>Prevalence</i>	2.067.674	23.641	459.846
<i>Nucleic Acid Amplification Techniques</i>	7.606	8	6.863
<i>Fluorescent Antibody Technique</i>	111.802	22	9.339
<i>Diagnostic Techniques and Procedures</i>	2.664	100	11.680
<i>Infertility, female</i>	25.118	88	21.107
<i>Pregnancy</i>	829.098	7.458	314.381
<i>Fallopian Tube Diseases</i>	2.927	2	1.448
<i>Urine</i>	319.570	2199	176.691

Tabela 2 - Resultado do cruzamento de busca de referências bibliográficas na base de dados PubMed

<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>
("Chlamydia trachomatis" OR "Chlamydia Infections") AND "Prevalence"	1926
("Chlamydia trachomatis" OR "Chlamydia Infections") AND "Prevalence" AND ("Infertility" OR "Pregnancy")	189
("Chlamydia trachomatis" OR "Chlamydia Infections") AND "Prevalence" AND "Diagnostic Techniques and Procedures"	592
("Chlamydia trachomatis" OR "Chlamydia Infections") AND "Prevalence" AND "Diagnostic Techniques and Procedures" AND ("Infertility" OR "Pregnancy")	77
"Urine" AND "Chlamydia trachomatis"	225
"Fluorescent Antibody Technique" AND "Chlamydia trachomatis"	430

Tabela 3 - Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, Scielo e CAPES através de DeCS

<b>Palavras-chave (DeCS)</b>	<b>Pubmed</b>	<b>Scielo</b>	<b>CAPES</b>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	13.918	172	28.776
Prevalência	175	20.468	25.357
Reação em Cadeia da Polimerase	4	814	1.853
Imunofluorescência	0	880	1.178
Diagnóstico	2.250	39.501	58.426
Infertilidade feminina	0	20	65
Gravidez	15	2.083	3.194



## 2. Marco conceitual esquemático

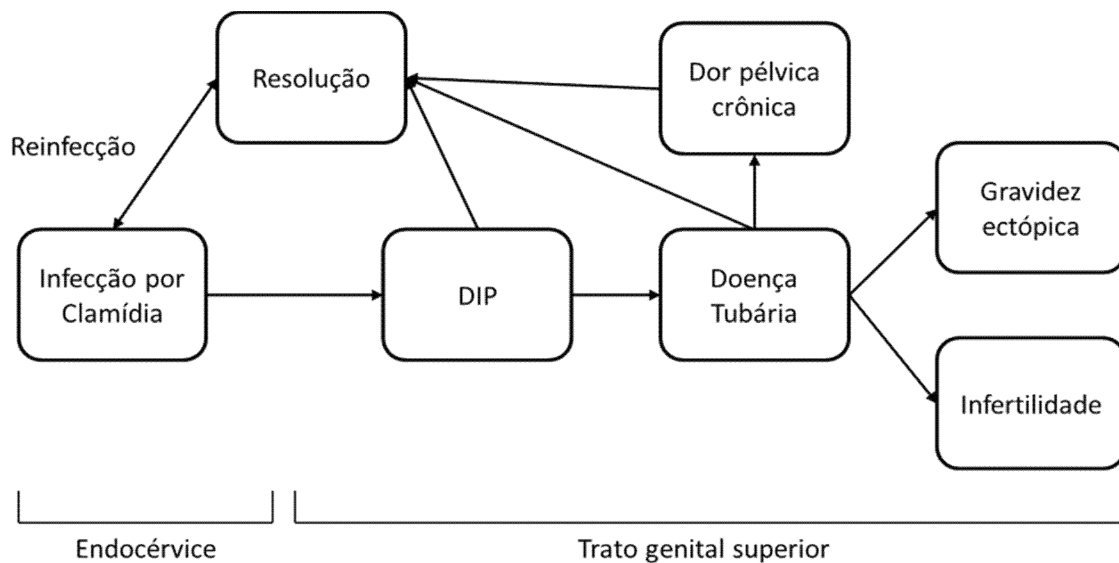


Figura 1 – História natural e sequelas da infecção por clamídia em mulheres

A infecção por clamídia inicia-se na endocérvice uterina e pode apresentar resolução espontânea. Entretanto, em certas mulheres, por causas multifatoriais, a clamídia pode ascender no trato genital e provocar quadro de infecção do trato genital superior, denominada doença inflamatória pélvica (DIP). Após a resolução, a DIP pode evoluir com dor pélvica crônica e/ou dano tubáreo. Por sua vez, o dano tubáreo aumenta o risco de infertilidade e gravidez ectópica.

## 3. A biologia da *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydiae* são bactérias patogênicas obrigatórias intracelulares de células eucariontes. Possuem morfologia cocóide, tamanho aproximado de 0,4  $\mu\text{m}$ , parede celular

semelhante à das bactérias gram-negativas, são imóveis e parasitas. Por terem vida intracelular obrigatória, foram originalmente consideradas vírus. Entretanto, diferentemente dos vírus, possuem RNA e DNA (Black, 1997).

O gênero *Chlamydia* possui quatro espécies: *Chlamydia trachomatis* e a *Chlamydia pneumoniae* que são patógenos exclusivamente humanos; a *Chlamydia psittaci* que, além de infectar vias aéreas de humanos, é agente de contaminação das aves e de alguns mamíferos inferiores; e a *Chlamydia pecorum*, responsável por infecção no gado, em ovinos e em suínos (Black, 1997).

A espécie *Chlamydia trachomatis* (CT) está dividida em aproximadamente 20 sorotipos agrupados em 3 biotipos com base em diferenças biológicas, os quais são responsáveis por doenças específicas: L1, L2, L2', L2a, L2b, L3, o linfogranuloma venéreo; A, B, Ba e C o tracoma; D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja, K, uretrites, cervicites e salpingites, além de conjuntivite de inclusão e pneumonia em recém-nascidos (Somboonna et al., 2008).

Essa bactéria possui restrições metabólicas: é incapaz de sintetizar ATP e necessita de fonte externa de energia. A parede celular é rica em lipopolissacarídeos e pobre em peptidoglicanos, o que lhe confere característica de bactéria gram-negativa.

A CT é uma bactéria imóvel, com ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos na célula hospedeira, formando inclusões citoplasmáticas características. Durante este ciclo encontram-se duas formas bem distintas: os corpos elementares (CE) e os corpos reticulares (CR). Os corpos elementares são a forma infecciosa, adaptada à vida extracelular e iniciam o processo de infecção da célula epitelial através de receptores superficiais. Após a adesão, os CE entram na célula por endocitose e permanecem em vacúolos intracelulares denominados corpos de inclusão.

Aproximadamente oito horas após a entrada na célula, os CE mudam para uma forma metabolicamente ativa originando os CR, os quais estão adaptados à multiplicação intracelular e replicam-se por divisão binária, completando-se o ciclo dentro do endossoma. O CR é maior em tamanho e mais rico em RNA; é a forma metabolicamente ativa e não-infecciosa da clamídia. Em 24 a 72 horas o CR retorna à forma CE, formando vacúolos contendo de 100 a 1.000 CE. Quando estes vacúolos substituem quase todo o citoplasma da célula hospedeira, ocorre lise e lançamento de CE para o meio extracelular, podendo dar início a um novo ciclo de infecção (Arráiz et al., 2008; Poiares et al., 2008).

A virulência da CT está relacionada a sua antigenicidade e às peculiaridades da sua membrana celular, que permitem a sobrevivência no meio extracelular, a adesão e entrada em células eucariontes e a capacidade de replicação no meio intracelular. Além disso, a presença do plasmídeo está relacionado à codificação de genes necessários para processo de replicação celular.

O genoma da CT é formado por um cromossoma circular com 1.042.519bp (58,7% de A-T) e um plasmídeo com 7493bp (número de acesso no *Gen Bank* AE001273). O genoma clamidial codifica para 875 proteínas, das quais setenta são exclusivas para a CT (Thomas et al., 1997). Em 2006 foi descrita na Suécia uma nova variante da *C. trachomatis* (nvCT), caracterizada por uma deleção de 377 pb no plasmídeo críptico, incluídos na sequência alvo para os principais testes comerciais diagnósticos utilizados na época (Ripa et al., 2006).

#### 4. A imunopatologia da *Chlamydia trachomatis*

A *Chlamydia trachomatis* possui antigenicidade complexa. Apesar disso, são poucos os antígenos importantes para o diagnóstico e patogênese da infecção: os antígenos lipopolissacarídeos (LPS) e o antígenos da *major outer membrane protein* (MOMP). O antígeno LPS, mais encontrado no CR, é constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico. Os antígenos da MOMP, codificados pelo gene *omp1*, são espécie e subespécie-específicos; por isso são utilizados para a sorotipagem (caracterização realizada através de painel de anticorpos monoclonais).

A CT é capaz de aderir à membrana celular dos espermatozóides até atingir o epitélio endocervical, onde inicia-se a infecção no trato genital feminino. Ali, os CE interagem com receptores tipo Toll (TLR), desencadeando a síntese de interleucina 8, citocina pró-inflamatória responsável pela depuração do processo infeccioso (da Costa et al., 2004). Foi descrita correlação entre polimorfismos dos TLR-1 e TLR-4 e maior suscetibilidade à infecção por CT (Taylor et al, 2012).

Com a entrada dos CE às células epiteliais, é desencadeada produção de citocinas (interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que promovem expressão de moléculas de adesão. Com isso, são atraídos macrófagos e polimorfonucleares, que produzem metaloproteases e espécies reativas de oxigênio, responsáveis por lesão e remodelamento tissular (López-Castro et al., 2012).

A seguir da resposta imune inata, inicia-se a resposta imune adaptativa, protagonizada pelos linfócitos T, principalmente o LT auxiliador CD4<sup>+</sup> subpopulação Th1 (LT-TH1), que secretam interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e, assim, estimulam a ação de fagócitos e a produção de IL-1 e IL-2, atraindo linfócitos citotóxicos e *Natural Killers* (NK). A

ativação seletiva das células Th1 leva à imunidade mediada por células, ao passo que a produção seletiva de células Th2 proporciona a imunidade humoral. No trato genital superior, predomina a resposta Th1, com perfil de citocinas pró-inflamatório. Já no trato genital inferior, parece predominar resposta Th2, menos eficaz que a resposta Th1 na depuração da infecção (Agrawal et al., 2009). Anticorpos IgA secretores, produzidos localmente, também desempenham um papel importante na neutralização da infecção primária. Seu papel é neutralizar os corpos elementares presentes no meio extracelular, impedindo sua adesão à mucosa. A meia vida da IgA é de 5 a 7 dias; portanto, sua presença correlaciona-se à infecção ativa aguda ou crônica persistente (Fresse et al., 2010).

Com relação à resposta humoral, foi constatado que mulheres com infertilidade e dano tubáreo possuem maiores títulos de imunoglobulina G (IgG) em relação às que não possuem dano tubáreo. Entretanto, não é claro se a imunidade humoral é protetora ou, paradoxalmente, relacionada a maior suscetibilidade a infecção persistente (López-Castro et al., 2012).

Na infecção aguda, a maioria dos anticorpos produzidos são direcionados às MOMP's e são considerados protetores. Entretanto, durante a infecção persistente, a CT gera maior expressão de proteínas de choque térmico 60 (HSP 60). As HSPs são um grupo de proteínas produzidas por células eucariontes e procariontes em resposta ao estresse, como inflamação, aumento de temperatura ou estresse oxidativo. As HSPs bacterianas possuem homologia de até 50% com as produzidas por células epiteliais e macrófagos humanos e são altamente antigênicas (Hjelholt et al., 2011). Com isso, pode ocorrer reação de hipersensibilidade tardia e até mesmo reação auto-imune local. Ocorre também maior produção de IL-2 e IFN-  $\alpha$ , associada ao dano tissular persistente, com posterior cicatrização e obstrução tubárea (Wunder et al., 2005).

Foram descritas taxas de depuração da infecção de 44,7% em pacientes assintomáticas e sem tratamento, em um período de um ano (López-Castro et al., 2012) e de 30-50% em 2 a 3 anos (Land et al., 2010). Em certos casos, mesmo não diagnosticada, a infecção primária não acarreta sequelas graves. Estudos experimentais em primatas demonstraram que a priminfecção por CT no trato genital superior feminino é geralmente autolimitada e não produz dano tubáreo (Patton et al., 1987). Entretanto, a exposição prolongada, a infecção crônica persistente e reinfecções frequentes são importantes fatores de risco para o dano tissular (Land et al., 2010).

A imunidade natural à infecção por CT é lenta e insuficiente, devido aos seus mecanismos de evasão imune. Dentre eles, há a variação antigênica das MOMP's e a capacidade de permanecer no trato genital em forma latente, com mínima expressão antigênica. Além disso, a proteção antigênica se deve ao fato de a replicação ocorrer no meio intracelular (Brunham et al, 2013) .

## **5. Manifestação Clínica da infecção por *Chlamydia trachomatis***

### **5.1 Infecção urogenital**

Aproximadamente 70 a 90% das infecções urogenitais por *Chlamydia trachomatis* em mulheres e 30 a 50% em homens são assintomáticas (Brunham et al., 2013).

Em homens, as principais manifestações são a uretrite, epididimite e prostatite e os sintomas mais prevalentes são disúria e descarga uretral hialina. Em mulheres, pode manifestar-se com cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP) e

abscessos de glândula de Bartholin. Os principais sintomas referidos são leucorréia, disúria, sinusorragia, metrorragia e dor pélvica (Chen et al, 2005). Mesmo em mulheres assintomáticas, pode-se constatar ao exame ginecológico presença de muco endocervical purulento, além de ectopia cervical hipertrófica e friável. Na presença de uretrite por CT, é comum a presença de disúria com piúria (presença de leucócitos na urina) e ausência de bacteriúria ou crescimento bacteriano à urocultura.

Deve-se suspeitar de DIP na presença de dor abdominal ou pélvica, sinais de cervicite, dor à mobilização cervical e/ou à palpação uterina ou anexial. Em 10 a 15% dos casos de DIP pode ocorrer perihepatite, quadro caracterizado por dor em quadrante superior direito do abdome ou dor pleurítica, sem alteração de transaminases. Esses casos, conhecidos por Síndrome de Fitzhugh-Curtis, podem resultar em aderências finas entre a cápsula hepática e o peritônio adjacente.

Infertilidade, dor pélvica crônica e gestação ectópica também são importantes consequências da infecção por CT (Paavonen and Lehtinen, 1996). Além disso, alguns estudos têm apontado que a CT atua como cofator na patogênese do câncer de colo de útero, juntamente com o papiloma vírus (HPV) (Jensen et al., 2014). A infecção por CT, mais raramente, pode desencadear quadro de artrite reativa que, quando acompanhada de uveíte e uretrite, denomina-se síndrome de Reiter. Esse quadro pode ocorrer em 1% dos homens com uretrite por CT e é ainda mais raro em mulheres.

O período de incubação até o aparecimento dos sintomas varia de 7 a 21 dias. Não se sabe ao certo por quanto tempo pacientes assintomáticos podem carrear e transmitir a infecção. Em uma revisão sistemática que incluiu dez estudos sobre infecções por CT não complicadas e sem tratamento, verificou-se que a infecção persistiu a curto prazo (semanas

a meses após o diagnóstico) em 56 a 89% dos casos e por um ano ou mais em 46 a 57% dos casos (Geisler, 2010).

Alguns hábitos foram relacionados a maior risco de DIP e gravidez ectópica, como a realização de duchas vaginais, manter relações sexuais durante período menstrual e tabagismo. A presença de vaginose bacteriana também facilitaria a ascensão da CT no trato genital através da ação de enzimas como a mucinase e a sialidase. Além disso, poliformismos do genes do complexo maior de histocompatibilidade e da interleucina 10 estariam relacionados a maior suscetibilidade à infecção por CT (Currie et al., 2007).

Devido ao curso assintomático ou oligossintomático e à falta de programas de rastreamento populacional, o diagnóstico da infecção por CT geralmente é tardio. Muitas vezes, o diagnóstico é realizado durante investigação de infertilidade (Al-Ramahi et al, 2008). O dano tubáreo corresponde a 25 a 35% das causas de infertilidade feminina (López-Castro et al., 2012). Price et al. (2012) basearam-se em dados publicados sobre sorologia para CT para criar um modelo estatístico que estimou que 45% (IC 95%= 28-62%) dos casos de infertilidade por causa tubárea são causados por CT.

Pelo menos 50% dos casos de DIP em países desenvolvidos são associados à CT (Dietrich et al., 2010). Entretanto, somente 50% das mulheres com infertilidade ou gravidez ectópica decorrente de infecção por CT referem episódio prévio de DIP (Brunham et al., 2013).

Estima-se que após 1 episódio de doença inflamatória pélvica, a taxa de infertilidade decorrente seja de 11%, aumentando para 23% e 54% após 2 ou 3 episódios, respectivamente (Westrom et al, 1992).

De acordo com a literatura, mulheres com infecção por CT não tratada têm um risco de 20% de desenvolver DIP. Destas, 10% necessitarão de hospitalização e 10%



apresentarão uma gravidez ectópica subsequente (Nyári et al., 2003). Um ensaio clínico randomizado realizado por Oakeshott et al. (2010) verificou que o risco relativo de desenvolver DIP após 1 ano de infecção assintomática por CT, sem tratamento, foi de 6.6 (95% CI 2.8, 15.5) e a incidência de DIP no grupo não tratado foi de 9% (IC 95%= 4-19%). O risco de desenvolver dor pélvica crônica após um episódio de DIP é de 18% (Fernandes et al., 2014). Em estudo multicêntrico realizado por Ness et al. (2002), aproximadamente um terço de 831 mulheres tratadas para DIP referiram dor pélvica crônica após 2 anos de seguimento. Entretanto, de acordo com van Valkengoed et al (2004), estes dados seriam superestimados pelo fato de que, nos estudos clássicos, o diagnóstico da infecção por CT era realizado através de cultura ou outros métodos menos sensíveis que a amplificação de ácidos nucleicos, diagnosticando somente casos de infecções mais graves, com maior risco de complicações clínicas. Os autores sugerem, no mesmo artigo, que o risco de progressão para DIP, gravidez ectópica e infertilidade tubárea após um episódio de infecção por CT seria de 0,43%, 0,07% e 0,02%, respectivamente.

O abscesso tubo ovariano é uma complicação de aproximadamente 0,8% dos casos de DIP (Ness et al., 2002) e pode requerer tratamento cirúrgico.

## 5.2 Outros tipos de infecção por CT

Outros tipos de infecção por CT, incluindo o linfogranuloma venéreo e o tracoma podem acometer homens e mulheres e são mais comuns em países em desenvolvimento.

O linfogranuloma venéreo é uma doença causada pelos sorotipos L1 a L3 da CT, que são mais invasivos e infectam a camada epitelial e tecidos moles subjacentes. O quadro inicial é úlcera genital indolor ou sintomas de proctocolite. O estágio secundário é

caracterizado por febre, calafrios, anorexia, mialgia e artralgias. A linfadenomegalia inguinal é frequente, principalmente em homens. Cerca de 30% das mulheres acometidas apresentam dor pélvica ou adenopatia inguinal. A ausência de tratamento pode acarretar úlceras e hipertrofia genital, artrite e formação de fístulas envolvendo reto, bexiga, vagina ou vulva (Black, 1997).

O tracoma é uma ceratoconjuntivite crônica causada pelo contato direto com os sorotipos A a C da *Chlamydia trachomatis* e é a principal causa de cegueira de origem infecciosa no mundo. A primeira fase da infecção, denominada tracoma ativo, costuma acometer crianças e é oligossintomática. Já a segunda fase, denominada doença cicatricial, é mais comum em adultos e pode cursar com triquíase, opacificação córnea e cegueira.

### 5.3 Infecção por CT e gestação

Alguns estudos correlacionam a infecção por CT a maior risco de abortamento de primeiro trimestre. Vigil et al. (2002) realizaram estudo *in vitro* utilizando microscopia eletrônica e detectaram a presença de CT na membrana de espermatozóides e na superfície e no interior do oócito. O estudo propõe dois modelos na patogênese da CT e abortamentos de primeiro trimestre: resposta imune à produção de proteínas de choque térmico expressas pelo zigoto em resposta à infecção por CT ou ainda infecção direta do zigoto pela CT transmitida pelo espermatozóide ou pelo epitélio do trato genital feminino.

Em gestantes, a taxa de infecção por CT varia de 2 a 35%. Alguns estudos correlacionaram a infecção por CT em gestantes a maior risco de trabalho de parto prematuro (TPP), ruptura prematura de membranas, baixo peso ao nascer e morte perinatal. Andrews et al. (2000), em um estudo caso-controle, verificaram que a prevalência de

infecção por CT na 24<sup>a</sup> semana de gestação era maior em mulheres que tiveram trabalho de parto prematuro abaixo de 35 e 37 semanas e, mesmo após análise multivariada para possíveis fatores de risco para TPP, encontraram um risco relativo de 2 a 3 vezes. Uma metanálise realizada por Silva et al. (2011) correlacionou a infecção por CT em gestantes a maior risco de parto prematuro, baixo peso ao nascer e morte perinatal. Os autores não encontraram associação entre a infecção com ruptura prematura de membranas, abortamento e endometrite puerperal.

Visto que a CT raramente é isolada no líquido e nas membranas amnióticas, especula-se que a ação direta da CT sobre o colo uterino resulte em seu apagamento e, com isso, predisponha a infecção ascendente por outras bactérias, o que levaria ao trabalho de parto prematuro (Andrews et al., 2000).

A *Chlamydia trachomatis* pode ser transmitida através do contato sexual ou verticalmente, no momento do parto, através do contato do feto com a microbiota vaginal materna. Há evidências que a taxa de transmissão vertical varia entre 50 e 70% (Currie et al., 2007). O risco de transmissão é maior no parto vaginal em relação à via alta, mesmo após ruptura prematura das membranas (Bell et al., 1994).

As manifestações no recém-nascido podem demorar até 3 meses para surgir e nem todos os casos de transmissão vertical apresentarão sintoma clínico. Em neonatos, as principais consequências da infecção por CT são a conjuntivite de inclusão e a pneumonia neonatal. Infecções faríngeas, vaginais e entéricas também já foram relatadas em neonatos.

A CT é responsável por 25 a 45% dos casos de pneumonia em crianças com menos de 6 meses de vida (Bekler et al., 2012) e é a principal causa de conjuntivite neonatal (Kakar et al., 2010). Estima-se que 10 a 20 % dos neonatos de gestantes infectadas por CT desenvolverão pneumonia e 20 a 50% desenvolverão conjuntivite (Bekler et al., 2012). Foi

descrita uma taxa de 17,1% de internação em unidade de terapia intensiva neonatal em recém-nascidos de gestantes infectadas por CT (Nyári et al., 2003).

A conjuntivite neonatal por CT costuma surgir 5 a 14 dias após o parto e cursa com níveis variáveis de edema e secreção ocular. Se prontamente diagnosticada e tratada, usualmente não provoca complicações. Casos não tratados podem persistir por meses e resultar em ulceração córnea.

A pneumonia neonatal por CT surge entre 4 a 8 semanas após o nascimento e manifesta-se por tosse seca, taquipnéia, congestão nasal, febre baixa ou ausente.

## **6. Diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis***

A detecção da infecção por CT ainda é um desafio devido à alta frequência de infecções assintomáticas. Mesmo os casos sintomáticos podem não ser diagnosticados por critérios exclusivamente clínicos devido ao quadro semelhante com as demais doenças sexualmente transmissíveis.

Vários métodos estão disponíveis para a detecção de CT em amostras de material biológico: exame direto (Giemsa), cultura de células, imunofluorescência direta (IFD), métodos imunoenzimáticos (EIA), a sonda de DNA (captura híbrida) e os métodos de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs). Além disso, a pesquisa de anticorpos anti- CT podem auxiliar no diagnóstico da infecção.

## 6.1 Giemsa

A visualização direta dos vacúolos de inclusão em esfregaços através do exame citológico direto por coloração de Giemsa pode ser útil no diagnóstico da conjuntivite de inclusão em recém-nascidos, mas é pouco sensível no diagnóstico da conjuntivite do adulto e de infecções do trato urogenital (Black, 1997).

## 6.2 Cultura

No passado, o cultivo celular foi considerado “padrão ouro” no diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Entretanto, o advento das técnicas moleculares e as limitações do método, como a labilidade de *Chlamydia trachomatis* nas amostras clínicas e variações de desempenho interlaboratorial do cultivo levaram a repensar esta condição.

A cultura é o único método que confirma a presença de microorganismo viável, visto que a detecção de antígenos, de anticorpos ou de ácidos nucléicos pode ser positiva mesmo na ausência de formas infecciosas da CT.

A coleta da amostra para cultura pode ser realizada por *swab* uretral ou endocervical. A cultura para CT é feita através da inoculação da amostra em uma cultura de células monocamada do tipo McCoy, Hela (*Henrietta Lacks*) ou BGMK (*buffalo green monkey kidney*). Se houver número suficiente de corpos elementares viáveis, ocorrerá infecção das células da cultura e formação de vacúolos de inclusão intracitoplasmáticos. Em 48 a 72 horas é realizada a visualização através de imunofluorescência direta, ou seja, adicionam-se anticorpos monoclonais fluorescentes contra a LPS ou a MOMP da CT à cultura e visualiza-se a fluorescência nos vacúolos de inclusão (Black, 1997).

A vantagem da cultura é a preservação do microorganismo para estudos adicionais, como antibiograma e genotipagem. Entre as desvantagens da cultura está a falta de padronização entre os laboratórios, método oneroso e trabalhoso, tempo médio de 3 a 7 dias até resultado e a necessidade de microorganismos viáveis; por isso, embora a especificidade seja 100,0%, a sensibilidade, mesmo em laboratórios de excelência, varia de 50 a 80,0% (Seadi et al., 2002).

### 6.3 Detecção de antígenos

Em relação à detecção de antígenos, existem dois grupos de testes: a imunofluorescência direta (IFD) e os métodos imunoenzimáticos (EIA). Ambos costumam ser realizados em amostras de *swab* endocervical ou uretral, assim como a cultura celular. Entretanto, também podem ser utilizadas amostras conjuntivais, retais e de vias aéreas superiores de crianças.

A IFD baseia-se em anticorpos monoclonais fluorescentes contra antígenos da CT, como a LPS (gênero específico) e a MOMP (espécie-específico). A IFD é capaz de avaliar simultaneamente a adequação da amostra (pelo menos uma célula colunar epitelial) e a presença dos antígenos MOMP e LPS. Apresenta sensibilidade que varia entre 80,0% a 90,0%, e especificidade de 98,0% a 99,0% em relação à cultura quando ambas são realizadas em condições ótimas (Black, 1997). Em relação aos NAATs, a sensibilidade é de cerca de 70%. A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado e a dificuldade em se processar um grande número de amostras. A experiência na interpretação da imunofluorescência é fundamental, porque a ligação inespecífica do anticorpo a outros microrganismos pode ocorrer, levando a um resultado falso-positivo (Seadi et al., 2002).

Entre suas vantagens está a execução rápida (cerca de 30 minutos) e, ao contrário da cultura, dispensa refrigeração da amostra durante o transporte.

Nos ensaios imunoenzimáticos, os anticorpos direcionados à LPS ou à MOMP são ligados a uma enzima e o produto final pode ser avaliado por espectrofotometria, fluorescência ou quimiluminescência. Dos diversos métodos imunoenzimáticos disponíveis no mercado, a técnica mais utilizada é a de ELISA (*enzyme linked immunoassay*) que, em função da natureza objetiva, permite a leitura de um grande número de amostras. O tempo de processamento manual varia de 3 a 4 horas. Comparados aos NAATs, sua sensibilidade varia de 65 a 75% e a especificidade é 97 a 99,5%, quando realizados testes confirmatórios (Chernesky, 2005).

Técnicas de EIA que empregam anticorpo anti-LPS apresentam a desvantagem de poderem resultar em reação cruzada com o LPS de outras bactérias gram-negativas como *Acinetobacter sp.*, membros da família das enterobactérias, *Gardnerella*, neisserias e salmonelas, levando a resultados falsamente positivos (Seadi et al., 2002).

#### 6.4 Detecção de anticorpos

Os testes para detecção de anticorpos, em geral, detectam anticorpos gênero-específicos, ou seja, contra o antígeno LPS presentes nos corpos elementares ou reticulares (Seadi et al., 2002). Os testes sorológicos não são recomendados para o diagnóstico de infecção por CT, exceto em casos de infecções em neonatos, em mulheres com infertilidade de causa tubárea e, ocasionalmente, em casos de linfogranuloma venéreo. Isso ocorre porque os anticorpos anti-CT têm meia vida longa e, se detectados, não distinguem o simples contato prévio de uma infecção ativa. Além disso, o risco de reações cruzadas com

outras espécies, principalmente com *Chlamydia pneumoniae*, torna duvidosa a aplicação clínica desses testes.

Pouco se sabe sobre o comportamento dos anticorpos durante infecções agudas ou crônicas por CT. Acredita-se que infecções leves produzem pouco estímulo antigênico e autores já correlacionaram a gravidade do dano tubáreo às titulações de anticorpos séricos (Land et al., 2010). Os anticorpos IgG persistem por anos, mesmo após o tratamento com antibióticos e são considerados marcadores de infecção prévia por CT (Gijzen et al., 2002). A produção de IgM é transitória e raramente detectada. Anticorpos IgA também têm pouco valor diagnóstico, exceto no caso de casos invasivos de linfogranuloma venéreo, pois são raramente detectados em casos de infecção aguda por CT e, quando encontrados, podem persistir por anos, mesmo após terapêutica adequada (Bax et al., 2003).

Os métodos disponíveis incluem a fixação do complemento, imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência (MIF) e testes imunoenzimáticos. Outros testes menos disponíveis utilizam hemaglutinação indireta, neutralização, precipitação, difusão em gel, imunoperoxidase e imunoeletroforese (Chernesky, 2005).

O teste de fixação de complemento, hoje pouco utilizado, reconhece anticorpos anti-LPS e, portanto, não é específico para espécies de clamídia.

A técnica de imunofluorescência indireta é realizada em dois passos de reações básicas. No passo um, o soro humano a ser testado entra em contato com o substrato antigênico (cultura de células infectadas por CT). O anticorpo, se presente no soro teste, irá ligar ao antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. O segundo passo envolve a adição de um anticorpo anti-humano marcado com fluoresceína. Se o complexo antígeno-anticorpo específico é formado no passo um, o anticorpo marcado com fluoresceína irá se ligar aos determinantes antigênicos do anticorpo do complexo no passo dois. Uma reação



positiva, verde-maçã fluorescente brilhante, pode ser vista com o auxílio de um microscópio de fluorescência.

A microimunofluorescência, desenvolvida por Wang e Grayston (1974), é o método “padrão-ouro” para o sorodiagnóstico da CT pois é bastante sensível e espécie e subespécie-específica. A técnica difere da IFI nos antígenos utilizados, que representam todas as espécies e sorotipos da clamídia e são empregados em quantidades mínimas. A MIF é a mais sensível entre as técnicas sorológicas, mas é laboriosa, de alto custo e sua interpretação é subjetiva e exige experiência (Tiitinen et al., 2006). Sua principal aplicação clínica é na detecção de anticorpos IgM nos quadros de pneumonia neonatal por CT.

Existem diversos testes para detecção imunoenzimática de anticorpos para CT disponíveis comercialmente. Os testes que detectam anticorpos direcionados à LPS são menos específicos, pois podem apresentar reação cruzada com anticorpos contra outras bactérias, principalmente a *C. pneumoniae* (Black, 1997). Os testes de ELISA mais recentes utilizam peptídeos sintéticos derivados da MOMP como antígenos e, portanto, têm desempenho comparável à microimunofluorescência (de Barbeyrac et al., 2006), com a vantagem de serem menos trabalhosos e apresentarem menor custo (Bax et al., 2003).

Os testes imunoenzimáticos também podem ser utilizados para a detecção de anticorpos anti-proteína de choque térmico da *C. trachomatis* (anti-CHSP60). Essas proteínas apresentam semelhanças antigênicas com outras bactérias e células eucariontes e, portanto, há risco de falso positivo por reação cruzada. Entretanto, a resposta imune à CHSP60 está relacionada a melhor predição de infecção crônica por CT e infertilidade tubárea em comparação aos anticorpos anti-MOMP ou anti-LPS (Hjelholt et al., 2011).

## 6.5 Captura híbrida

As técnicas de detecção de ácidos nucleicos começaram a ser amplamente aplicadas a partir da década de 80, por serem mais rápidas, sensíveis e não dependerem da viabilidade da amostra. Sondas de DNA com seqüência complementar ao RNA ribossomal 16S do genoma da clamídia e marcadas com éster de acridina, ao hibridizar com o DNA da clamídia, são absorvidas por magnetismo, e a reação é quantificada com o uso de um luminômetro. A sensibilidade varia entre 60% e 80%, e a especificidade, entre 95% e 99% (Seadi et al., 2002). Teoricamente, o nível de detecção é de 103 corpos elementares. Por não envolverem amplificação do material genético, requerem coleta de material endocervical ou uretral e não permitem métodos menos invasivos de coleta. A principal vantagem desse método é seu baixo custo. Entretanto, por serem menos sensíveis que os NAATs, perderam sua competitividade no mercado e atualmente são menos utilizados. Existem somente dois testes comerciais aprovados para uso nos Estados Unidos: o *Gen-Probe PACE 2* e o *Digene Hybrid Capture II* (Papp et al., 2014).

## 6.6 Testes de amplificação de ácidos nucleicos

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) são considerados “padrão-ouro” e se tornaram o método de escolha do diagnóstico de infecção do trato genital pois, além de apresentarem excelentes sensibilidade e especificidade, permitem a auto-coleta de amostras por métodos menos invasivos, como urina e secreção vaginal. Podem também ser realizados em amostras endocervicais, uretrais, retais, conjuntivais, faríngeas, endometriais, tubáreas e seminais.

Cook et al. (2005), em revisão sistemática, compararam o desempenho das amostras de 1º jato urinário e endocervicais para pesquisa de CT por NAATs e concluíram que não há perda significativa de sensibilidade ou especificidade com o uso de amostras urinárias.

Roberts et al. (2011) comparou o desempenho do PCR em amostras urinárias e endocervicais de mais de 2 mil gestantes e encontrou prevalências similares (4,1% e 4,3% , respectivamente). Entretanto, outro estudo demonstrou que o uso de amostras de secreção vaginais (auto-coletadas ou não) conferem maior sensibilidade que amostras urinárias e endocervicais (Hobbs et al., 2008). Portanto, em mulheres, amostras de secreção vaginal são o meio de escolha para a realização de NAATs. Amostras endocervicais são aceitáveis, caso seja realizado exame ginecológico. Amostras urinárias podem ser utilizadas, mas apresentam sensibilidade 10% menor (Schachter et al., 2005; Masek et al., 2009). Em homens, amostras de 1º jato urinário são a primeira opção, mas a coleta uretral também é aceitável (Papp et al., 2014).

A sensibilidade desses testes é maior que 95%, cerca de 20 a 50% maior em relação à cultura, EIA e IFD (Seadi et al., 2002). Sua alta sensibilidade é decorrente da capacidade de detectar uma única cópia de DNA ou RNA alvo e obter milhares de cópias da sequência alvo, através de *primers* (iniciadores). Por detectarem sequências espécie-específicas, não há riscos de falsos-positivo, exceto se houver contaminação da amostra. Portanto, a especificidade é de 100% (Papp et al., 2014).

Assim como outros testes não-culturais, os NAATs não requerem que a amostra apresente microorganismos viáveis. Isso deve ser considerado caso sejam realizados testes após o tratamento, para confirmação de cura. Acredita-se que após o tratamento com doxiciclina, o PCR para CT pode permanecer positivo por até 3 semanas (Black, 1997)

Os métodos de detecção de ácidos nucléicos têm por alvo seqüências gênicas da MOMP, do plasmídeo críptico ou do rRNA de *Chlamydia trachomatis*. Os testes direcionados ao plasmídeo críptico são 10 vezes mais sensíveis que os direcionados ao gene da MOMP, visto que há 10 cópias do plasmídeo em cada corpo elementar e somente uma cópia do *omp1* (Jenab et al., 2010). A PCR-MOMP (não-disponível comercialmente) tem sido utilizada como método de confirmação de resultados positivos ou discordantes e para a genotipagem.

Os NAATs consistem na amplificação do DNA ou RNA da CT através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA) ou amplificação de deslocamento (SDA). O PCR e o SDA amplificam seqüência de nucleotídeos do plasmídeo críptico, presente em múltiplas cópias em cada corpo elementar da CT. Já o TMA é direcionado ao RNA ribossomal, que também está presente em múltiplas cópias. Teoricamente, o limite de detecção seria de menos de um corpo elementar de CT. Entretanto, na prática, a sensibilidade é menor que 100% porque possíveis problemas na coleta da amostra e a reações de inibição podem influenciar o resultado (Chernesky, 2005).

Existem diversos NAATs comerciais aprovados para uso nos Estados Unidos: Abbott RealTime CT/NG (*Abbott Molecular Inc. Des Plaines, Illinois*), Amplicor e Cobas CT/NG test (*Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, New Jersey*); Aptima COMBO 2, (*Hologic/Gen-Probe, San Diego, California*); BD ProbeTec ET e BD ProbeTec Qx (*Becton Dickinson, Sparks, Maryland*), e Xpert CT/ NG Assay (*Cepheid, Sunnyvale, California*) Os testes comerciais diferem quanto o método de amplificação e quanto à seqüência alvo de ácidos nucléicos. O Amplicor, o Cobas e o Abbott RealTime CT/NG usam PCR e os testes da *Becton Dickison* usam o SDA para amplificar seqüências de DNA presentes no

plasmídeo críptico, encontradas em mais de 99% das linhagens de CT. O teste Aptima usa a técnica de TMA para detectar uma sequência específica presente no RNA ribossomal. Exceto o Amplicor e o Xpert, todos são capazes de detectar a nova variante da CT (nvCT). Estes testes também realizam a detecção simultânea da *Neisseria gonorrhoeae* (Papp et al., 2014).

Além dos testes comerciais disponíveis, diversos métodos de PCR “*in house*” foram descritos (Hartley et al., 2001). De acordo com Rampersad et al. (2007), essas técnicas podem ser alternativas economicamente mais viáveis para países em desenvolvimento. Primeiramente realiza-se a extração do DNA a ser analisado utilizando-se tratamento com detergentes ou através de aquecimento. O DNA extraído é juntado a um tubo contendo solução tampão, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), os *primers* direcionados à sequência alvo e a enzima taq-polimerase. A mistura é colocada no termociclador, que faz ciclos de temperatura pré-estabelecidos com tempos exatos específicos para cada reação (fragmento a ser amplificado). Inicialmente ocorre a desnaturação da dupla hélice e hibridização dos *primers* às sequências complementares. A enzima taq-polimerase promove a adição de bases, compondo uma nova molécula de DNA que servirá de molde para múltiplos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Com isso, haverá uma amplificação logarítmica de um segmento de DNA. A posterior detecção dessa sequência pode ser realizada por captura híbrida ou eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Seadi et al., 2002). Técnicas de PCR em tempo real (qPCR), através de técnicas de fluorescência, permitem análise quantitativa simultânea à realização da reação (Abdella et al., 2015).

## 6.7 Testes rápidos

Testes rápidos para CT podem ser realizados em consultórios pois dispensam equipamentos sofisticados e fornecem resultado qualitativo em aproximadamente 30 minutos. A maioria dos testes rápidos envolvem métodos imunoenzimáticos para detecção de antígenos da LPS e, portanto, apresentam risco de reação cruzada com outras espécies (Land et al., 2010). Mais recentemente, foi lançado um teste rápido baseado na tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos. O Xpert CT/NG (Cepheid) detecta DNA em amostras endocervicais, vaginais e urinárias e fornece resultado em até 90 minutos, com desempenho comparável ao de NAATs realizados em laboratório (Turner et al., 2014). Acredita-se que a implementação de testes rápidos poderia reduzir a quantidade de pessoas infectadas não tratadas por perda de seguimento (Swain et al., 2004).

## 7. Tratamento da infecção por *Chlamydia trachomatis*

O tratamento da infecção urogenital por CT pode ser realizado através do uso de azitromicina 1g via oral em dose única ou doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia por 7 dias (Workowski et al., 2015). Uma metanálise de 12 ensaios clínicos randomizados mostrou que esses dois antibióticos são igualmente eficazes, com taxas de cura de 97 e 98%, respectivamente (Lau et al., 2002).

Como a infecção por CT não confere imunidade suficiente para prevenir a reinfeção, mediante um caso positivo é importante orientar que parceiros sexuais recentes procurem serviço de saúde para testagem e tratamento. Além disso, orienta-se abstinência

sexual por 7 dias após o tratamento do casal. Em uma revisão sistemática, foi descrita taxa de reinfecção de 13,9% (Hosenfeld et al., 2009).

## **8. Rastreamento da infecção por *Chlamydia trachomatis***

Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda o uso de NAATs para diagnóstico de pessoas com suspeita clínica de infecção por CT. Nas pessoas assintomáticas, os NAATs também são os testes recomendados para o rastreamento rotineiro. Recomenda-se rastrear pessoas sexualmente ativas que apresentem risco de infecção ou de complicações por CT. Nesse quadro incluem-se mulheres abaixo de 25 anos, gestantes, mulheres com novo parceiro ou com múltiplos parceiros, homens em relações homossexuais e pessoas portadoras de HIV, independentemente da idade. Além disso, qualquer pessoa com infecção documentada por *N. gonorrhoeae* deve ser testada (Workowski et al., 2015).

Quanto ao rastreamento das gestantes, o CDC recomenda que todas sejam rastreadas para infecção por CT na primeira consulta de pré natal. As gestantes abaixo de 25 anos ou que possuam outros fatores de risco devem ser submetidas a novo rastreamento no terceiro trimestre e todos os casos diagnosticados devem ser tratados. Além disso, recomenda-se que todas as pacientes tratadas realizem novo teste em 3 a 4 semanas após o tratamento para comprovar a cura e sejam novamente testadas após 3 meses (Workowski et al., 2015).

## 9. Epidemiologia da infecção por *Chlamydia trachomatis*

Considera-se que a infecção urogenital por CT é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais prevalente no mundo (Weinstock et al, 2004). Esta infecção é mais comum em mulheres jovens sexualmente ativas, especialmente entre adolescentes (Wilson et al, 2002).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (Newman et al., 2015), coletados entre 2005 e 2012, a prevalência global de CT em mulheres entre 15-49 anos é de 4,2% (IC 95%=3,7-4,7%). Em homens, a prevalência estimada é de 2.7% (IC 95%=2.0–3.6%). A incidência estimada foi de 131 milhões de novos casos de infecção por CT no mundo, em 2012.

Nos Estados Unidos foram reportadas mais de 1,3 milhão de infecções por CT no ano de 2010 (CDC, 2011), cerca de 100.000 delas em gestantes. A incidência é de 456,7 casos para cada 100 mil pessoas. Devido ao curso assintomático e à subnotificação, acredita-se que o número de pessoas infectadas ao ano seja próximo de 4 milhões. Neste país, o gasto associado à infecção por CT e suas sequelas foi de 516,7 milhões de dólares americanos no ano de 2008 (Owusu-Edusei et al., 2008).

De acordo com dados de 2007 a 2012, o *Center of Disease Control and Prevention* (CDC) estima que, nos Estados Unidos, a prevalência de CT em indivíduos entre 14 e 39 anos seja de 1,7% (intervalo de confiança [IC] 95% = 1.4%–2.0%) e de 4,7% (IC = 3.2%–6.1%) em mulheres sexualmente ativas entre 14 e 24 anos (Torrone et al., 2014). Foi encontrada associação entre o risco de infecção com a idade, estado civil, etnia, número de parceiros sexuais, renda e nível educacional.



Blatt et al. (2012) utilizaram dados de 761 mil gestantes que realizaram testes moleculares para CT no período de 2005 a 2008 nos Estados Unidos e verificaram uma prevalência geral de 3,5%. A taxa de infecção correlacionou-se com a faixa etária: foi de 16% em gestantes com 16 anos, sofreu queda linear até os 26 anos (3%) e manteve-se praticamente estável dos 26 aos 40 anos.

Na Europa, conforme dados publicados pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) em 2014, a prevalência de CT em mulheres varia de 1,1% (Noruega) a 6,9% (Estônia). Considerando somente mulheres abaixo de 25 anos, a prevalência variou de 1.9% (Holanda) a 10.7% (Dinamarca).

Estudos de outros países mostram prevalência variável de CT em gestantes jovens: 3,2% na Austrália (Cheney et al., 2006), 18,1% na China (Chen et al., 2006) e 23,4% no Japão (Yamazaki et al., 2012).

Em um caso-controle realizado no Irã (Rashidi et al, 2013), a prevalência de CT através de PCR na urina de mulheres inférteis foi de 12,4%, sem diferença significativa em relação ao grupo controle de gestantes assintomáticas (9,4%). No mesmo estudo, não foi encontrada diferença significativa de anticorpos anti-CT entre os grupos.

Em estudo semelhante realizado em Gana (Siemer et al, 2008), não houve diferença na prevalência de CT através de PCR na urina entre mulheres com infertilidade secundária (2,4%) em relação ao grupo controle de gestantes assintomáticas (1,6%). Entretanto, houve diferença significativa entre os grupos em relação à prevalência de anticorpos específicos para CT IgG (39% versus 19%).

No Brasil, a infecção por CT não é uma doença de notificação compulsória e não há estratégias de rastreamento populacional. Portanto, os dados disponíveis são baseados em estudos pequenos em populações específicas, demonstrando a carência de estudos maiores,

envolvendo diferentes regiões do país. Os últimos dados oficiais brasileiros foram divulgados há mais de 15 anos. Estimativas da Coordenação Nacional de DST/AIDS (1999) apontam a incidência de aproximadamente 1,9 milhão de casos novos ao ano e uma prevalência de 3,5% em mulheres sexualmente ativas e 2,3% em homens sexualmente ativos.

São poucos os estudos brasileiros que utilizaram métodos de amplificação de ácidos nucleicos para verificar a prevalência de *Chlamydia trachomatis*.

Ramos et al (2003) realizaram um estudo de base populacional em mulheres entre 15 e 44 anos residentes em Porto Alegre-RS e encontraram uma prevalência de CT de 0,59% em amostras urinárias. Em Curitiba-PR, a prevalência de CT em urina em mulheres jovens sexualmente ativas assintomáticas foi de 10,7% (Piazzetta et al, 2011). Um outro estudo realizado em Vitória-ES constatou a prevalência de CT de 12,2% em amostras urinárias de 464 adolescentes sexualmente ativas (Miranda et al, 2004). Em Goiânia, Araújo et al. (2006), usando o teste PCR Amplicor (Roche) em amostras endocervicais, testaram 296 adolescentes e adultas jovens entre 12 e 24 anos (86 grávidas e 210 não grávidas) para CT e encontraram uma prevalência geral de 19,6%. Não houve diferença significativa de prevalência entre as gestantes e não gestantes.

Um estudo realizado em Manaus (Borborema-Alfaia et al., 2013) utilizou uma técnica de PCR “*in house*” para pesquisar a presença de CT em amostras endocervicais de 100 gestantes e apontou uma prevalência de 11%. Outro estudo transversal realizado em Fortaleza- CE incluiu 1019 gestantes e verificou a presença de CT em 11% das amostras (Martins et al., 2004). Em um estudo que envolveu seis capitais brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre) e incluiu 3.303 gestantes a

prevalência média de infecção por CT detectada por captura híbrida foi de 9,4% (Jalil et al., 2008).

Posteriormente, Pinto et al. (2011) realizaram outro estudo multicêntrico para estimar a prevalência de CT em gestantes de 15 a 24 anos, através de PCR em amostra urinária. A prevalência geral encontrada foi de 9,8% (IC 95%= 8,5-11,1), sendo que no Nordeste a prevalência foi maior que na região Sul (14,1% e 6,9%, respectivamente). Foi vista associação com idade entre 15-19 anos, história de sexarca abaixo de 15 anos, mais de um parceiro sexual, história de drogadição, múltiplos parceiros sexuais e coinfeção por *N. gonorrhoeae*. As gestantes com infecção por CT tiveram maior risco de trabalho de parto prematuro em relação às não infectadas (21,8% versus 16,1%;  $p < 0,05$ ).

Santos et al. (2003) pesquisaram a presença de CT em amostras endocervicais de mulheres atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis em Manaus e encontraram taxa de infecção de 20,7%. Outro estudo realizado em Manaus (de Lima Freitas et al., 2011) encontrou uma prevalência de 52,8% de CT em uma população de mulheres atendidas por infertilidade.

Machado et al. (2007) verificaram a prevalência de PCR e anticorpos para CT em 55 mulheres com dano tubáreo e compararam com 55 controles. A prevalência de IgG foi maior no grupo de pacientes com dano tubáreo (56,4 x 31%  $p < 0,01$ ) e, nestas, a positividade do PCR endocervical foi de 3,6%. Os autores verificaram associação entre a presença de anticorpos IgG e maior número de parceiros sexuais.

Pantoja et al. (2012) estudaram a prevalência de CT em amostras endocervicais de 176 mulheres candidatas a fertilização *in vitro* em um serviço de Campinas-SP, utilizando PCR e captura híbrida. Foi encontrado somente 1,1% de exames positivos. Os autores consideraram que a baixa prevalência encontrada poderia estar relacionada à possibilidade

de muitas mulheres já terem realizado tratamento empírico para infecção por CT em algum momento durante a propedêutica da infertilidade.

Diversos estudos mostram que mulheres com infertilidade por causa tubárea têm maior prevalência de anticorpos IgG para CT que a população (Currie et al., 2007). Um estudo indiano (Sharma et al., 2002) encontrou prevalência de IgG anti-CT de 68% em mulheres com infertilidade, 50% em mulheres com mau passado obstétrico e apenas 10% em gestantes saudáveis.

Baseado na correlação entre a presença de anticorpos IgG para CT e dano tubáreo, diversos autores sugerem que este exame seja solicitado rotineiramente durante investigação de infertilidade (Thomas et al., 2000; den Hartog et al., 2004). A microimunofluorescência é a técnica de detecção de anticorpos com melhor acurácia no diagnóstico de doença tubárea (Broeze et al., 2011). Uma metanálise concluiu que a sorologia IgG tem sensibilidade que varia de 30 a 88% e especificidade de 45 a 100% na predição de infertilidade tubárea (Sonmez et al., 2008). Alguns estudos consideram que a presença de IgG detectada por imunofluorescência indireta tem valor preditivo comparável ou superior à histerossalpingografia (Dabekausen et al., 1994; Mol et al., 1997). Perquin et al. (2007) demonstraram que a sorologia para CT e a histerossalpingografia têm capacidade semelhante de predizer dano tubáreo e gestação espontânea, embora ambos os testes apresentem baixo desempenho.

Os principais fatores de risco para infecção por CT identificados são: idade abaixo de 25 anos, múltiplos parceiros ou novo parceiro sexual nos últimos 3 meses, uso irregular de preservativo, história prévia de infecção por CT ou de outra doença sexualmente transmissível e menor nível socioeconômico (Datta et al., 2007).

Hwang et al. (2014), em uma coorte de 629 mulheres seguidas por quase 7 anos, verificaram uma incidência de CT de 15% e encontraram correlação significativa entre risco de infecção por CT e história prévia de HPV, tabagismo e drogadição.

## **JUSTIFICATIVA**

Para aprimorar estratégias de prevenção, rastreamento e tratamento da infecção por *Chlamydia trachomatis* é necessário conhecimento da prevalência dessa afecção em nosso meio. Neste contexto, verificamos a prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* em gestantes assintomáticas e em mulheres inférteis em uma amostra da população de Porto Alegre-RS.

## **HIPÓTESES**

### **HIPÓTESE NULA**

A prevalência de *Chlamydia trachomatis*, através de imunofluorescência indireta para pesquisa de IgG sérico e PCR em amostra urinária, em mulheres inférteis não é maior que a de gestantes assintomáticas.

### **HIPÓTESE ALTERNATIVA**

A prevalência de *Chlamydia trachomatis*, através de imunofluorescência indireta para pesquisa de IgG sérico e PCR em amostra urinária, em mulheres inférteis é maior que a de gestantes assintomáticas.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO GERAL

Comparar a prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis em relação a gestantes assintomáticas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a prevalência de anticorpos específicos para CT nos grupos estudados.

Identificar a prevalência de CT na urina através de PCR nos grupos estudados.

Identificar prováveis fatores associados à infecção por CT.

## REFERÊNCIAS

- Abdella RMA, Abdelmoaty HI, Elsherif RH, Sayed AM, Sherif NA, Gouda HM, et al. Screening for Chlamydia trachomatis in Egyptian women with unexplained infertility, comparing real-time PCR techniques to standard serology tests: case control study. *BMC Womens Health*. 2015;15:45.
- Agrawal T, Vats V, Salhan S, Mittal A. The mucosal immune response to chlamydia trachomatis infection of the reproductive tract in women. *J Reprod Immunol* 2009;83:173-8
- Al-Ramahi M, Mahafzah A, Saleh S, Fram K. Prevalence of Chlamydia trachomatis infection in infertile women at a university hospital in Jordan. *East Mediterr Health J*. 2008;14(5):1148-54.
- Andrews WW, Goldenberg RL, Mercer B, Iams J, Meis P, Moawad A, et al. The Preterm Prediction Study: Association of second-trimester genitourinary chlamydia infection with subsequent spontaneous preterm birth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000;183(3):662–8.
- Araújo RSC, Guimarães EMB, Alves MFC, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FCR, et al. Prevalence and risk factors for Chlamydia trachomatis infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 23 de maio de 2006;25(6):397–400.
- Arráiz N, Marcucci R, Urdaneta B, Colina S, Romero Z. Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por Chlamydia trachomatis. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. setembro de 2008;68(3):195–201.
- Bax CJ, Mutsaers J a. EM, Jansen CL, Trimpos JB, Dörr PJ, Oostvogel PM. Comparison of serological assays for detection of Chlamydia trachomatis antibodies in different groups of obstetrical and gynecological patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. janeiro de 2003;10(1):174–6.
- Bekler C, Kultursay N, Ozacar T, Sayiner A, Yalaz M, Akisu M. Chlamydial infections in term and preterm neonates. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(1):1–6.
- Bell TA, Stamm WE, Kuo CC, et al. Risk of perinatal transmission of Chlamydia trachomatis by mode of delivery. *J Infect* 1994; 29:165.
- Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Reviews*. 1997; 1:160-184.
- Blatt AJ, Lieberman JM, Hoover DR, Kaufman HW. Chlamydial and gonococcal testing during pregnancy in the United States. *Am J Obstet Gynecol*. julho de 2012;207(1):55.e1–8.

- Borborema-Alfaia APB de, Freitas NS de L, Astolfi Filho S, Borborema-Santos CM. Chlamydia trachomatis infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance. *Braz J Infect Dis*. outubro de 2013;17(5):545–50.
- Brasil, Ministério da Saúde, SPC-CNDST/aids. Manual de Controle de DST, 3ª ed., Brasília, 1999.
- Broeze KA, Opmeer BC, Coppus SFPJ, Van Geloven N, Alves MFC, Anestad G, et al. Chlamydia antibody testing and diagnosing tubal pathology in subfertile women: an individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Update*. junho de 2011;17(3):301–10.
- Brunham RC, Rappuoli R. Chlamydia trachomatis control requires a vaccine. *Vaccine* 2013;31(15):1892–7.
- CDC. Sexually transmitted disease surveillance, 2010. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2011.
- Chen MY, Rohrsheim R, Donovan B. Chlamydia trachomatis infection in Sydney women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005;45(5):410-3.
- Chen XS, Yin YP, Chen LP, Thuy NT, Zhang GY, Shi MQ, et al. Sexually transmitted infections among pregnant women attending an antenatal clinic in Fuzhou, China. *Sex Transm Dis* 2006;33:296–301.
- Cheney K, Chen MY, Donovan B. Chlamydia trachomatis infection among antenatal women in Sydney. *Aust N Z J Public Health* 2006;30:85–7.
- Chernesky MA. The laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(1):39–44.
- Cook RL, Hutchison SL, Østergaard L, et al. Systematic review: noninvasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Ann Intern Med* 2005; 142:914.
- Currie MJ, Bowden FJ. The importance of chlamydial infections in obstetrics and gynaecology: an update. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. fevereiro de 2007;47(1):2–8.
- Da Costa CU, Wantia N, Kirschning CJ, Busch DH, Rodriguez N, Wagner H, et al. Heat shock protein 60 from Chlamydia pneumoniae elicits an unusual set of inflammatory responses via Toll-like receptor 2 and 4 in vivo. *Eur J Immunol* 2004;34:2874-84.
- Dabekausen YA, Evers JL, Land JA, Stals FS. Chlamydia trachomatis antibody testing is more accurate than hysterosalpingography in predicting tubal factor infertility. *Fertil Steril*. maio de 1994;61(5):833–7.
- Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, et al. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. *Ann Intern Med* 2007;147:89.



de Barbeyrac B, Papaxanthos-Roche A, Mathieu C, Germain C, Brun JL, Gachet M, Mayer G, Bebear C, Chene G, Hocke C. Chlamydia trachomatis in subfertile couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 129:46–53.

de Lima Freitas NS, Borborema-Santos CM, Barroso Serrão das Neves D, Costa de Oliveira CM, Dutra Ferreira JR, Astolfi-Filho S. High prevalence detection of Chlamydia trachomatis by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72(4):220–6.

den Hartog JE, Land JA, Stassen FRM, Slobbe-van Drunen MEP, Kessels AGH, Bruggeman CA. The role of chlamydia genus-specific and species-specific IgG antibody testing in predicting tubal disease in subfertile women. *Hum Reprod*. junho de 2004;19(6):1380–4.

Dietrich W, Rath M, Stanek G, Apfalter P, Huber JC, Tempfer C. Multiple site sampling does not increase the sensitivity of Chlamydia trachomatis detection in infertility patients. *Fertil Steril* 2010;93(1):68–71.

European Centre for Disease Prevention and Control. Chlamydia control in Europe: literature review. Stockholm: ECDC; 2014.

Fernandes LB, Arruda JT, Approbato MS, García-Zapata MTA, Fernandes LB, Arruda JT, et al. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infection: factors associated with infertility in women treated at a human reproduction public service. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2014;36(8):353–8.

Fresse, A., J. Sueur, and F. Hamdad. Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. *Indian Journal of Medical Microbiology* Oct.-Dec. 2010: 326.

Geisler WM. Duration of untreated, uncomplicated Chlamydia trachomatis genital infection and factors associated with chlamydia resolution: a review of human studies. *J Infect Dis* 2010; 201 Suppl 2:S104.

Gijsen AP, Land JA, Goossens VJ, Slobbe MEP, Bruggeman CA. Chlamydia antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. *Hum Reprod* 2002;17:699–703.

Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J, Ridgway G. PCR detection and molecular identification of Chlamydiaceae species. *J Clin Microbiol*. setembro de 2001; 39(9):3072–9.

Hjelholt A, Christiansen G, Johannesson TG, Ingerslev HJ, Birkelund S. Tubal factor infertility is associated with antibodies against Chlamydia trachomatis heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60. *Hum Reprod*. agosto de 2011;26(8):2069–76.

Hobbs MM, van der Pol B, Totten P, et al. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis* 2008; 35:8.

Hosenfeld CB, Workowski KA, Berman S, et al. Repeat infection with Chlamydia and gonorrhea among females: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis* 2009; 36:478–489.

Hwang LY, Ma Y, Moscicki A-B. Biological and behavioral risks for incident Chlamydia trachomatis infection in a prospective cohort. *Obstet Gynecol.* novembro de 2014;124(5):954–60.

Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC de, Garcia EG, et al. Prevalence of Chlamydia and Neisseria gonorrhoeae infections in pregnant women in six Brazilian cities. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* dezembro de 2008;30(12):614–9.

Jenab A, Roghanian R, Golbang N, Golbang P, Chamani-Tabriz L. Comparison of three methods of DNA extraction in endocervical specimens for Chlamydia trachomatis infection by spectrophotometry, agarose gel, and PCR. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* junho de 2010;58(3):227–34.

Jensen KE, Thomsen LT, Schmiedel S, et al. Chlamydia trachomatis and risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in women with persistent human papillomavirus infection: a cohort study. *Sex Transm Infect* 2014; 90:550.

Kakar S, Bhalla P, Maria A, Rana M, Chawla R, Mathur NB. Chlamydia trachomatis causing neonatal conjunctivitis in a tertiary care center. *Indian J Med Microbiol.* março de 2010;28(1):45–7.

Land JA, Van Bergen JE a. M, Morré SA, Postma MJ. Epidemiology of Chlamydia trachomatis infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update.* abril de 2010;16(2):189–204.

Lau CY, Qureshi AK. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sex Transm Dis* 2002;29:497–502.

López-Castro TM, Rojas-Díaz EL, Rojas-Rojas FN, Díaz-Yamal IJ, Muñoz-Cerón J. Immune response modulation mechanisms induced by Chlamydia trachomatis associated with infertility. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* dezembro de 2012;63(4):346–55.

Machado ACS, Guimarães EMB, Sakurai E, Fioravante FCR, Amaral WN, Alves MFC. High titers of Chlamydia trachomatis antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2007;2007:24816.

Martins TA, Bello PY, Pontes LRSK, Costa LV, Miralles IS, Queiroz TRBS. As doenças sexualmente transmissíveis são problemas entre gestantes no Ceará? DST j bras doenças sex transm. 2004;50–8.

Masek BJ, Arora N, Quinn N, et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an Internetbased screening program. *J Clin Microbiol* 2009;47:1663–7

Miranda AE, Szcwaecwald CL, Peres RL, Page-Schafer K et al. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis* 2004 Sep; 31(9):542-546.

Mol BW, Dijkman B, Wertheim P, Lijmer J, van der Veen F, Bossuyt PM. The accuracy of serum chlamydial antibodies in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *Fertil Steril.* junho de 1997;67(6):1031–7.

Ness RB, Soper DE, Holley RL, Peipert J, Randall H, Sweet RL, et al. Effectiveness of inpatient and outpatient treatment strategies for women with pelvic inflammatory disease: results from the Pelvic Inflammatory Disease Evaluation and Clinical Health (PEACH) Randomized Trial. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 929-937.

Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS ONE.* 8 de dezembro de 2015;10(12):e0143304.

Nyári T, Deák J, Nagy E, Veréb I, Kovács L, Mészáros G, et al. Epidemiological study of *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant women in Hungary. *Sex Transm Infect* 1998;74(3):213–5.

Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, Hay S, Taylor-Robinson D, Simms I, Hay P. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ* 2010; 340: c1642.

Owusu-Edusei K, Chesson HW, Gift TL, et al. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis* 2013;40:197–201.

Paavonen J, Lehtinen M. Chlamydial pelvic inflammatory disease. *Hum. Reprod. Updat.* 1996; 2: 519 – 529.

Pantoja M, Campos EA, Pitta D da R, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes AM dos S. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women candidates for in vitro fertilization at a public institution of the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* setembro de 2012;34(9):425–31.

Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. MMWR Recomm Rep. 14 de março de 2014;63(0):1–19.

Patton DL, Kuo CC, Wang SP, Brenner RM, Sternfeld MD, Morse SA, Barnes RC. Chlamydial infection of subcutaneous fimbrial transplants in cynomolgus and rhesus monkeys. J Infect Dis 1987;155:229–235.

Perquin DA, Beersma MF, de Craen AJ, Helmerhorst FM. The value of chlamydia trachomatis-specific IgG antibody testing and hysterosalpingography for predicting tubal pathology and occurrence of pregnancy. Fertil Steril 2007;88:224–6.

Piazzetta RCPS, Carvalho NS, Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. Prevalência da infecção por *Chlamydia Trachomatis* e *Neisseria Gonorrhoea* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011; 33(11):328-33

Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocêncio LA, Miranda AE. *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. Sex Transm Dis. outubro de 2011;38(10):957–61.

Poiães L de A, Sandrini F, Osório P de S, Largura Á, Simão R de CG. Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real. Rev bras anal clin. 2008;40(3):229–32.

Price MJ, Ades AE, Welton NJ, Macleod J, Turner K, Simms I, Horner PJ. How much tubal factor infertility is caused by *Chlamydia*? Estimates based on serological evidence corrected for sensitivity and specificity. Sex Transm Dis 2012; 39: 608-613.

Ramos MC, Becker D, Germany C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela Reação em cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. J Bras DST 2003; 15(2):12.

Rampersad J, Wang X, Gayadeen H, Ramsewak S, Ammons D. In-house polymerase chain reaction for affordable and sustainable *Chlamydia trachomatis* detection in Trinidad and Tobago. Rev Panam Salud Publica. novembro de 2007;22(5):317–22.

Rashidi BH, Chamani-Tabriz L, Haghollahi F, Jeddi-Tehrani M, Naghizadeh MM, Shariat M, et al. Effects of *Chlamydia trachomatis* Infection on Fertility; A Case-Control Study. J Reprod Infertil. 2013;14(2):67–72.

Ripa T, Nilsson P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. Euro Surveill. 2006;11(11).

- Roberts SW, Sheffield JS, McIntire DD, Alexander JM. Urine screening for Chlamydia trachomatis during pregnancy. *Obstet Gynecol.* abril de 2011;117(4):883–5.
- Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* abril de 2003;7(2):91–5.
- Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, et al. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis* 2005;32:725–8.
- Seadi CF, Oravec R, Poser B von, Cantarelli VV, Rossetti ML. Laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infection: advantages and disadvantages of the tests. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2002;38(2):125–33.
- Sharma K, Aggarwal A, Arora U. Seroprevalence of Chlamydia trachomatis in women with bad obstetric history and infertility. *Indian J Med Sci* 2002; 56: 216–217.
- Siemer J, Theile O, Larbi Y, Fasching PA, Danso KA, Kreienberg R, et al. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for infertility among women in Ghana, West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* fevereiro de 2008;78(2):323–7.
- Silva MJPM de A, Florêncio GLD, Gabiatti JRE, Amaral RL do, Eleutério Júnior J, Gonçalves AK da S. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: a meta-analysis study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15(6):533-9.
- Somboonna N, Mead S, Liu J, Dean D. Discovering and differentiating new and emerging clonal populations of Chlamydia trachomatis with a novel shotgun cell culture harvest assay. *Emerging infectious diseases.* 2008;14(3):445–53.
- Sönmez S, Sönmez E, Yasar L, Aydin F, Coskun A, Süt N. Can screening Chlamydia trachomatis by serological tests predict tubal damage in infertile patients? *New Microbiol.* janeiro de 2008;31(1):75–9.
- Swain GR, McDonald RA, Pfister JR, Gradus MS, Sedmak GV, Singh A. Decision analysis: point-of-care Chlamydia testing vs. laboratory-based methods. *Clin Med Res.* fevereiro de 2004;2(1):29–35.
- Taylor BD, Darville T, Ferrell RE, Kammerer CM, Ness RB, Haggerty CL. Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with Chlamydia trachomatis among women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis* 2012;205:603-9.
- Thomas K, Coughlin L, Mannion PT, Haddad NG. The value of Chlamydia trachomatis antibody testing as part of routine infertility investigations. *Hum Reprod.* maio de 2000;15(5):1079–82.

Thomas NS, Luscher M, Storey CC et al. Plasmid diversity in Chlamydia. *Microbiology* 1997; 143:1847-54.

Tiitinen A, Surcel H-M, Halttunen M, Birkelund S, Bloigu A, Christiansen G, et al. Chlamydia trachomatis and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. *Hum Reprod.* 6 de janeiro de 2006;21(6):1533–8.

Torrone E, Papp J, Weinstock H, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of Chlamydia trachomatis genital infection among persons aged 14-39 years--United States, 2007-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63:834.

Turner KME, Round J, Horner P, Macleod J, Goldenberg S, Deol A, et al. An early evaluation of clinical and economic costs and benefits of implementing point of care NAAT tests for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea in genitourinary medicine clinics in England. *Sex Transm Infect.* março de 2014;90(2):104–11.

van Valkengoed IG, Morre SA, van den Brule AJ, Meijer CJ, Bouter LM, Boeke AJ. Overestimation of complication rates in evaluations of Chlamydia trachomatis screening programmes – implications for cost-effectiveness analyses. *Int J Epidemiol* 2004; 33: 416–425.

Vigil P, Tapia A, Zacharias S, Riquelme R, Salgado AM, Varleta J. First-trimester pregnancy loss and active Chlamydia trachomatis infection: correlation and ultrastructural evidence. *Andrologia* 2002;34(6):373–8.

Wang SP, Grayston JT. Human serology in Chlamydia trachomatis infection with microimmunofluorescence. *J Infect Dis* 1974;130:388-97.

Weinstock H, Berman S, Cates WJr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence em prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health.* 2004;36(1):6-10.

Westrom L, Joesoef R, Reynolds G, Hagdu A, Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility. A cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. *Sex Transm Dis* , 1996; 19: 185–192.

Wilson JS, Honey E, Templeton A, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, et al. A systematic review of the prevalence of Chlamydia trachomatis among European women. *Hum Reprod Update* 2002;8(4):385-94.

Workowski KA, Bolan GA, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* 2015; 64:1.

Wunder PR, Cajueiro, JC. A imunologia e a imunopatologia das infecções causadas por Chlamydia trachomatis: Artigo de Revisão. *Visão Acadêmica* 2005; 2:62-71.

Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis* 2012;12:82.

## ARTIGO

### ***Chlamydia trachomatis* infection in infertile and pregnant women in southern Brazil**

Deborah Beltrami Gomez<sup>1</sup>, Ivan Sereno Montenegro<sup>1</sup>, Guilherme Rezende Baade<sup>2</sup>, Paula Barros Terraciano<sup>1</sup>, Raquel de Almeida Schneider<sup>3</sup>, Débora Helena Zanini Gotardi<sup>3</sup>, Victória Furquim dos Santos Cardoso<sup>3</sup>, Eduardo Pandolfi Passos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Bolsista de Iniciação Científica: Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, HCPA, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Deborah Beltrami Gomez

Rua Doutor Alcides Cruz, 81/706, 90.630-160 – Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 8409-4008

E-mail: [deborahbeltrami@hotmail.com](mailto:deborahbeltrami@hotmail.com)



## Summary

**Background:** *Chlamydia trachomatis* (CT) is the most prevalent sexually transmitted bacterial infection and affects mainly young, sexually active, women. Untreated infection may lead to reproductive complications due to tubal damage. Infections during pregnancy may cause preterm labor, low birth weight, perinatal death and neonatal conjunctivitis and pneumonia. There are few data on CT infection in Brazil. The aim of this study was to determine CT prevalence on infertile and pregnant women.

**Methods:** A cross-sectional study included 77 infertile and 60 asymptomatic pregnant women. First void urine was tested to CT using PCR and blood samples were collected for CT IgG antibodies testing using Indirect Immunofluorescence. A questionnaire about medical, gynecological and sexual history was applied to all participants.

**Results:** We found statistically similar prevalence of PCR and IgG antibodies between groups. This study observed a 61% prevalence of CT IgG antibodies in infertile women and 56,7% in pregnant women. PCR was positive in only one (1,3%) infertile woman and in none of the pregnant.

**Conclusion:** A high prevalence of *C. trachomatis* IgG antibody in Brazilian pregnant and infertile women, but a low prevalence of positive PCR on urine samples were demonstrated. CT antibodies were associated with sexual behavior and smoking.

**Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia* infections, prevalence, Nucleic Acid Amplification Techniques; Infertility, female; Fluorescent Antibody Technique.

### **Author Disclosure Statement**

The authors declare that no competing financial interests exist for the present paper.

## Introduction

*Chlamydia trachomatis* (CT) is the most prevalent sexually transmitted bacterial infection<sup>1</sup>. According to the World Health Organization (WHO), 131 million people were infected worldwide in 2012<sup>2</sup>. It affects mainly young, sexually active, women<sup>3</sup>. Most infections due to *C. trachomatis* are asymptomatic<sup>4</sup>. In women, untreated infection may lead to pelvic inflammatory disease (PID) with the risk of serious reproductive complications, such as chronic pelvic pain, tubal factor infertility (TFI) and ectopic pregnancy<sup>5</sup>. Studies suggest that chlamydial infection in pregnant women can enhance the risk of preterm labor, low birth weight perinatal death<sup>6</sup>. Additionally, CT vertical transmission usually causes neonatal inclusion conjunctivitis and/or pneumonia<sup>7</sup>.

Among various methods available for the CT infection diagnosis, nucleic acid amplification tests (NAATs) are preferable due to its high sensibility and specificity and because they can be performed using non-invasive samples, such as urine and vaginal swabs<sup>8</sup>. *Chlamydia* immunoglobulin (Ig) G antibodies persist for years even after antibiotic treatment and are used as markers of a past infiltrating *C. trachomatis* infection<sup>9</sup>.

In Brazil, since routine screening is not recommended in public health service, there are few data on CT infection. The purpose of this study was to estimate the prevalence of CT infection in infertile and in pregnant women attending in a southern Brazilian public hospital.

## Methods

### *Subjects*

A cross-sectional study in infertile and pregnant women attending at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) was made in the period of January to December 2015. Participants were divided in two groups. Group infertile (n=77) included women attending infertility clinic of HCPA that were unable to conceive after one year of regular unprotected sexual intercourse. Group pregnant (n=60) included pregnant asymptomatic women of any gestational age. Exclusion criteria were similar for both groups: acute symptoms of pelvic inflammatory disease, use of antibiotics on the last 30 days, age under 18 years old and refuse to participate of the study. First-void urine (FVU) for *C. trachomatis* “in house” *Polymerase Chain Reaction* (PCR) test and a single venous blood sample for indirect immunofluorescence (IFI) for *C. trachomatis* serological testing were collected from all participating women. Additionally, all women answered a questionnaire about their sexual and gynecological medical history.

### *Laboratory methods*

Antibody testing was performed by indirect immunofluorescence in blood samples in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre laboratory. The commercial kit Viro-Immun (VIRO-IMMUN Labor-Diagnostika GmbH Oberursel / Germany) was used. First void urine samples were immediately shipped to Amplicon laboratory and PCR was performed using “in house” method developed according to previous studies<sup>11, 12</sup>.

### *Ethical aspects*

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all patients were informed about this research through the Free and Clarified Consent Term.

### *Statistical analysis*

Sample size was calculated using the WinPEPI program (*Programs for Epidemiologists for Windows*) 11.43 version and was based on previous findings of IgG prevalence (39% in infertile and 19% in pregnant women)<sup>10</sup>. Considering a 95% confidence interval and a statistical power of 71,6%, we obtained n=77 infertile and n=60 pregnant participants. Data processing and analyses were performed using the software SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, Ill, USA). Initially, a descriptive analysis of the main characteristics of the participants, and its related risk factors was performed. Quantitative variables were described by mean and standard deviation (mean±SD) or median value and interquartile amplitude (median±IQ). Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. We used t-student test to compare quantitative variables. Mann-Whitney U test was performed when data distribution were asymmetrical. Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test were applied to sets of categorical data. We also calculated IgG's sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, the accuracy and the Odds Ratio to predict tubal factor infertility.  $P \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

FVU and serum samples of 60 healthy pregnant women and 77 infertile women were investigated. Pregnant women were younger and presented lower rates of steady sexual partner, previous PID and previous pelvic surgery than the infertile group. They also presented higher rates of regular condom use. Sample characteristics are summarized on Table 1. The mean gestational age was 30,6 weeks ( $\pm 7,4$ ) among pregnant women. In the infertile group, median time of infertility was 6 years (3-10). Primary infertility was found in 84,4% of women and tubal damage was present in 54% of them. Sixteen women (20,8%) suffered from more than one cause of infertility (Table 2). We found statistically similar prevalences of PCR and IgG antibodies between groups. However, infertile women had higher IgG titulation median (Table 3). Comparing the TFI subgroup with controls, there were statistically more individuals with high titulation ( $\text{IgG} \geq 128$ ) levels among infertile women (Table 4). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), accuracy and odds ratio were calculated concerning IgG's ability to predict tubal damage (Table 5). We found association between positive IgG antibody test and higher number of sexual partners in life (Table 6). IgG high titulation level ( $\text{IgG} \geq 128$ ) was associated with younger age of first sexual intercourse, higher number of sexual partners and smoking (Table 7). Individuals with tubal factor infertility had previous history of PID more likely than women with other causes of infertility (Table 8).

## Discussion

Using different diagnostic methods, we found no significant differences between fertile and infertile women for *C. trachomatis* infection. This study observed a 61% prevalence of CT IgG antibodies in infertile women and 56,7% in pregnant women. A study performed in India<sup>13</sup> found a 68% prevalence of CT IgG antibodies in infertile women and 10% in healthy pregnant women. Siemer et al.<sup>10</sup> also showed statistically different prevalences of CT IgG between infertile and pregnant women (39% versus 19%, respectively). Rashidi et al.<sup>14</sup>, using ELISA to test IgG antibodies, observed lower rates of seroprevalence and found no difference between infertile and pregnant women (9% versus 5%, respectively). In our study, the high prevalence of CT antibodies in pregnant women may result to cross-reaction with *C. pneumoniae*, since most serological test are not species specific.

PCR in first void urine was positive in only one (1,3%) infertile and in none pregnant participants. Previous studies in Brazil found variable prevalence of CT using NAATs. Ramos et al.<sup>15</sup> tested 161 women between 15 and 44 years old in Porto Alegre-RS and found a 0,59% CT prevalence in urine samples. Two multicentric studies were performed in Brazil to estimate CT prevalence in pregnancy and found a 9,8% prevalence when FVU was used to perform PCR analysis and 9,4% when hybrid capture was performed in endocervical swabs<sup>16,17</sup>.

Some authors believe that CT IgG antibodies are as accurate as hysterosalpingography (HSG) in predicting tubal factor infertility<sup>18</sup>. In our study, IgG titulation of 128 presented better diagnostic properties on predicting tubal damage.

Nevertheless, our findings regarding IgG were worse than previous studies. Malik et al<sup>19</sup> found a 72.7% sensitivity, 80% positive predictive value, 77.7% specificity and 70% negative predictive value of IgG antibodies measured by ELISA. A meta-analysis performed in 2008 indicated that the predictive value of CT antibody test for tubal pathology is limited: its sensitivity varies between 30% and 88%, and the specificity varies between 45% and 100%<sup>20</sup>.

We found correlation between IgG presence and younger age of first sexual intercourse, higher number of sexual partners and smoking. This finding agrees with previous studies. Datta et al<sup>21</sup> concluded that age under 25 years old, multiple sexual partners, irregular use of condom and previous history of any sexual transmitted disease are risk factors to CT infection.

One limitation of our study is that pregnant women were tested mostly in the third trimester of pregnancy. So, we could not differentiate infections that occurred previously or during pregnancy. Besides that, the low prevalence of positive PCR in infertile women could be explained by the fact that almost 43% of them had documented previous empirical treatment with azithromycin during infertility investigation. Furthermore, *C.trachomatis* may persist in a viable and metabolically active state in the upper genital tract, despite negative PCR results on urine or endocervical samples<sup>22</sup>. In addition, we have to consider that the mean age in our study population was relatively high, and more than 91% of women in our population had a steady sexual partner. Because most CT infections occurs in younger than 25 years old and sexually promiscuous people, the high seroprevalence of CT and the low rates of positive PCR found in our study is understandable.



## **Conclusion**

In conclusion, we demonstrated a statistically similar high prevalence of *C. trachomatis* IgG antibody in Brazilian pregnant and infertile women, but a low prevalence of positive PCR on urine samples. CT antibodies were associated with sexual behavior and smoking.

## References

1. Weinstock H, Berman S, Cates WJr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence em prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*. 2004;36(1):6-10.
2. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0143304.
3. Wilson JS, Honey E, Templeton A, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, et al. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European women. *Hum Reprod Update* 2002;8(4):385-94.
4. Brunham RC, Rappuoli R. *Chlamydia trachomatis* control requires a vaccine. *Vaccine* 2013;31(15):1892–7.
5. Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, Hay S, Taylor-Robinson D, Simms I, Hay P. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ* 2010; 340: c1642
6. Silva MJPM de A, Florêncio GLD, Gabiatti JRE, Amaral RL do, Eleutério Júnior J, Gonçalves AK da S. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: a meta-analysis study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2011; 15(6):533–9.
7. Bekler C, Kultursay N, Ozacar T, Sayiner A, Yalaz M, Akisu M. Chlamydial infections in term and preterm neonates. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(1):1–6.
8. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* — 2014. *MMWR Recomm Rep*. 2014;63(0):1–19.
9. Land JA, Van Bergen JE a. M, Morré SA, Postma MJ. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update* 2010;16(2):189–204.
10. Siemer J, Theile O, Larbi Y, Fasching PA, Danso KA, Kreienberg R, et al. *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for infertility among women in Ghana, West Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78(2):323–7.
11. Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 1990;28(9):1968–73.

12. Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J, Ridgway G. PCR detection and molecular identification of Chlamydiae species. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3072–9.
13. Sharma K, Aggarwal A, Arora U. Seroprevalence of Chlamydia trachomatis in women with bad obstetric history and infertility. *Indian J Med Sci* 2002; 56: 216–217.
14. Rashidi BH, Chamani-Tabriz L, Haghollahi F, Jeddi-Tehrani M, Naghizadeh MM, Shariat M, et al. Effects of Chlamydia trachomatis Infection on Fertility; A Case-Control Study. *J Reprod Infertil.* 2013;14(2):67–72.
15. Ramos MC, Becker D, Germany C. Estudo populacional de prevalência de Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae pela Reação em cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. *J Bras DST* 2003; 15(2):12.
16. Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocência LA, Miranda AE. Chlamydia trachomatis prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. *Sex Transm Dis.* 2011;38(10):957–61.
17. Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC de, Garcia EG, et al. Prevalence of Chlamydia and Neisseria gonorrhoeae infections in pregnant women in six Brazilian cities. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2008;30(12):614–9.
18. Perquin DA, Beersma MF, de Craen AJ, Helmerhorst FM. The value of chlamydia trachomatis-specific IgG antibody testing and hysterosalpingography for predicting tubal pathology and occurrence of pregnancy. *Fertil Steril* 2007;88:224–6.
19. Malik A, Jain S, Rizvi M, Shukla I, Hakim S. Chlamydia trachomatis infection in women with secondary infertility. *Fertil Steril.* 2009;91(1):91–5.
20. Sönmez S, Sönmez E, Yasar L, Aydin F, Coskun A, Süt N. Can screening Chlamydia trachomatis by serological tests predict tubal damage in infertile patients? *New Microbiol.* 2008;31(1):75–9.
21. Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, et al. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. *Ann Intern Med* 2007;147:89.
22. Machado ACS, Guimarães EMB, Sakurai E, Fioravante FCR, Amaral WN, Alves MFC. High titers of Chlamydia trachomatis antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2007;2007:24816.

Table 1 – Sample characteristics

Variables	Infertile (n=77)	Pregnant (n=60)	p
Age (years) – mean ± SD	32.8 ± 4.4	27.1 ± 6.4	<0.001
Number of pregnancies – median (P25 – P75)	0 (0 – 1)	2 (1 – 3)	<0.001
Previous abortion – n(%)	20 (26.0)	13 (21.7)	0.701
Age of first sexual intercourse (years) – mean ± SD	16.4 ± 2.3	16.3 ± 1.9	0.710
Number of sexual partners – median (P25 – P75)	3 (1 – 4.5)	3 (2 – 5)	0.488
Steady sex partner – n(%)	77 (100)	55 (91.7)	0.015
Condom regular use – n(%)	4 (5.2)	15 (25.0)	0.002
Previous PID – n(%)	25 (32.5)	2 (3.3)	<0.001
Previous ectopic pregnancy – n(%)	7 (9.1)	1 (1.7)	0.079
Previous pelvic surgery – n(%)	33 (42.9)	3 (5.0)	<0.001
Previous HPV infection – n(%)	12 (15.6)	4 (6.7)	0.179
Smoking – n(%)	10 (13.0)	4 (6.7)	0.354

Table 2 – Infertile group characteristics

Variables	Infertile (n=77)
Previous empirical treatment – n(%)	33 (42.9)
Primary infertility – n(%)	65 (84.4)
Time of infertility (years) – median (P25 – P75)	6 (3 – 10)
Causes of infertility – n(%)	
Tubal damage	42 (54.5)
Other causes	47 (61.0)
Anovulation	11 (14.3)
Endometriosis	15 (19.5)
Male	20 (26.0)
Uterine	1 (1.3)
Multiple causes – n(%)	16 (20.8)

Table 3 – Prevalence of CT IgG and PCR on groups

CT test	Infertile (n=77)	Pregnant (n=60)	P
IgG- n(%)			0.733
Positive	47 (61.0)	34 (56.7)	
Negative	30 (39.0)	26 (43.3)	
IgG titulation– md (P25 -P75)	256 (128 – 512)	128 (64 – 256)	0.016
IgG ≥128 – n(%)	39 (50.6)	19 (31.7)	0.040
PCR			1.000
Positive	1 (1.3)	0 (0.0)	
Negative	76 (98.7)	60 (100)	

Table 4 – Prevalence of CT IgG and PCR on tubal factor infertility subgroup and in pregnant

CT test	TFI infertility (n=42)	Pregnant (n=60)	P
IgG			0.571
Positive	27 (64.3)	34 (56.7)	
Negative	15 (35.7)	26 (43.3)	
IgG titulation – md (P25 – P75)	256 (128 – 512)	128 (64 – 256)	0.002
IgG $\geq$ 128 – n(%)	26 (61.9)	19 (31.7)	0.005
PCR			-
Positive	0 (0.0)	0 (0.0)	
Negative	42 (100)	60 (100)	

Table 5 –IgG diagnostic properties in predicting tubal damage

Diagnostic properties	Positive (>0)	IgG ≥ 128	IgG ≥ 256
Sensitivity	64.3%	61.9%	47.6%
Especificidade	42.9%	62.9%	71.4%
PPV	57.4%	66.7%	66.7%
NPV	50.0%	57.9%	53.2%
Accuracy	54.5%	62.3%	58.4%
Odds Ratio	1.35	2.75	2.27



Table 6 - Association between participants characteristics and IgG positivity

Variables*	IgG Positive (IgG >0) (n=81)	IgG Negative (IgG=0) (n=56)	p
Age	30.6 ± 5.7	29.8 ± 6.5	0.423
Age of first sexual intercourse	16.1 ± 2.1	16.8 ± 2.0	0.060
Number of sexual partners	3 (2 – 5)	2 (1 – 4)	0.036
Steady sexual partner	77 (95.1)	55 (98.2)	0.648
Condom use	13 (16.0)	6 (10.7)	0.524
Previous IPD	17 (21.0)	10 (17.9)	0.815
Previous ectopic pregnancy	6 (7.4)	2 (3,6)	0.471
Previous pelvic surgery	26 (32.1)	10 (17.9)	0.096
Previous HPV infection	11 (13.6)	5 (8.9)	0.574
Smoking	11 (13.6)	3 (5.4)	0.202
Number of pregnancies	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	0.186

\* described by mean ± SD, median (percentile 25 – 75) or n(%)

Table 7 - Association between participants characteristics and IgG titulation

Variables*	High titulation (IgG $\geq$ 128) (n=58)	Low titulation (IgG<128) (n=79)	P
Age	30.5 $\pm$ 5.3	30.1 $\pm$ 6.6	0.743
Age of first sexual intercourse	15.7 $\pm$ 1.9	16.8 $\pm$ 2.2	0.002
Number of sexual partners	3.5 (2 – 7)	2 (1 – 4)	0.007
Steady sexual partner	54 (93.1)	78 (98.7)	0.162
Condom use	10 (17.2)	9 (11.4)	0.466
Previous IPD	15 (25.9)	12 (15.2)	0.182
Previous ectopic pregnancy	6 (10.3)	2 (2.5)	0.071
Previous pelvic surgery	20 (34.5)	16 (20.3)	0.094
Previous HPV infection	8 (13.8)	8 (10.1)	0.696
Smoking	10 (17.2)	4 (5.1)	0.041
Number of pregnancies	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	0.912

\* described by mean  $\pm$  SD, median (percentile 25 – 75) or n (%)

Table 8 - Association between participants characteristics and tubal factor infertility

Variables	Tubal factor infertility (n=42)	Other causes of infertility (n=35)	P
Age	32.7 ± 4.1	32.9 ± 4.7	0.825
Number of pregnancies	0 (0 – 2)	0 (0 – 1)	0.094
Age of first sexual intercourse	16.2 ± 1.7	16.7 ± 2.8	0.347
Number of sexual partners	3 (1 – 5)	3 (1 – 4)	0.354
Condom use	2 (4.8)	2 (5.7)	1.000
Previous IPD	22 (52.4)	3 (8.6)	<0.001
Previous ectopic pregnancy	6 (14.3)	1 (2.9)	0.119
Previous pelvic surgery	20 (47.6)	13 (37.1)	0.488
Previous HPV infection	8 (19.0)	4 (11.4)	0.547
Smoking	5 (11.9)	5 (14.3)	1.000

\* described by mean ± SD, median (percentile 25 – 75) or n (%)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a alta prevalência de infecção por *C. trachomatis*, suas consequências ao futuro reprodutivo feminino e aumento de risco de condições potencialmente fatais, como gravidez ectópica e doença inflamatória pélvica, deveria haver mais atenção por parte de gestores de saúde para implementação de políticas de prevenção, rastreamento populacional, diagnóstico e tratamento precoce e, assim, prevenção de sequelas.

## PERSPECTIVAS

Visto à relevância do assunto, consideramos a realização de estudo prospectivo com maior número de participantes e incluindo população de mulheres jovens e adolescentes, que são os indivíduos com maior risco de infecção. Nas gestantes, é necessária a correlação com desfechos gestacionais e neonatais. Assim, contribuiremos para atentar que a infecção por *C. trachomatis* é um problema de saúde pública. Por isso, o Brasil deveria seguir a tendência mundial e adotar estratégias de prevenção primária, rastreamento e diagnóstico precoce dessa infecção e, com isso, diminuir a ocorrência de suas sequelas, que oneram o sistema de saúde e acarretam consequências graves à saúde feminina.

## ANEXOS

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)- investigação de infertilidade

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Investigação de Infertilidade)**

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado “Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis e gestantes assintomáticas”. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível que pode se relacionar a infecções pélvicas, dor pélvica crônica, infertilidade, entre outros problemas. Este estudo visa verificar a presença dessa bactéria em gestantes e mulheres inférteis. Você está sendo convidada a participar desta pesquisa porque faz parte do Ambulatório de Infertilidade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e está realizando investigação ou tratamento para infertilidade. Tal pesquisa tornará possível conhecer melhor a epidemiologia dessa infecção para aprimorar as estratégias de rastreamento e tratamento em nosso meio.

Sua participação no projeto consistirá na coleta de uma amostra de sangue para pesquisa de anticorpos contra a *Chlamydia trachomatis*. Esse exame faz parte da avaliação rotineira das mulheres atendidas para investigação de infertilidade. Adicionalmente, será coletada uma amostra de urina também para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*. Este exame não faz parte da avaliação rotineira nesta Instituição, e se trata de um exame mais sensível que investiga a mesma infecção, que em caso de resultado positivo, pode diferenciar uma infecção que está ativa de um simples contato prévio com a bactéria *Chlamydia trachomatis*. Além disso, será aplicado um questionário a respeito de seu histórico ginecológico e de saúde em geral, que deve durar em torno de 10 minutos.

Esta pesquisa pode lhe trazer benefícios, visto que terá a oportunidade de realizar um exame mais sensível para complementar a investigação de infertilidade que não é oferecido rotineiramente nesta instituição. Com isso, aumentamos a chance de detectar uma

possível infecção pela *Chlamydia trachomatis*. Caso seu exame seja positivo para infecção ativa por *Chlamydia trachomatis*, serão fornecidos esclarecimentos e tratamento para você e seu parceiro na sua próxima avaliação médica. Não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos neste estudo.

Você é livre para escolher participar ou não deste estudo, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo do seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição ou a de seu médico, se assim você desejar. Todos os resultados obtidos serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua identidade.

Informamos que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo e que você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Esclarecimentos a respeito da pesquisa poderão ser realizados através de contato com o pesquisador responsável, Dr Eduardo Pandolfi Passos, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ou através do telefone (51) 3359-8000. Alternativamente, é possível procurar a pesquisadora Dra Deborah Beltrami Gomez, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, telefone (51) 3359-8117. Em caso de dúvidas, é possível contatar o Comitê de Ética em Pesquisa, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo uma delas entregue a você e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
(gestantes)**

Você está sendo convidada a participar do grupo controle do projeto de pesquisa intitulado “Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis e gestantes assintomáticas”, pois é uma gestante em atendimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível que pode se relacionar a infecções pélvicas, dor pélvica crônica, infertilidade, entre outros problemas. Este estudo visa verificar a presença dessa bactéria em gestantes e mulheres inférteis. Esta pesquisa tornará possível conhecer melhor a epidemiologia dessa infecção para aprimorar as estratégias de rastreamento e tratamento em nosso meio.

Sua participação no projeto consistirá na coleta de uma amostra de sangue e uma amostra de urina para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*. Nenhum destes exames faz parte da avaliação rotineira de gestantes, pois não há nenhuma suspeita ou sintoma que indique que você possua esta bactéria. Além disso, será aplicado um questionário a respeito de seu histórico ginecológico e de saúde em geral, que deve durar em torno de 10 minutos.

Esta pesquisa pode lhe trazer benefícios, visto que terá a oportunidade de realizar exames sensíveis para detecção de uma infecção pela *Chlamydia trachomatis*, mesmo sem apresentar sintomas de infecção. Caso seu teste seja positivo para infecção ativa pela *Chlamydia trachomatis*, a equipe de pesquisadores entrará em contato telefônico, a ser fornecido por você, para agendar uma consulta médica para lhe fornecer orientações e prescrever o tratamento para você e seu parceiro. Não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos neste estudo, você apenas poderá sentir um desconforto em relação à coleta de sangue ou apresentar um pequeno hematoma no local.

Você é livre para escolher participar ou não deste estudo, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo do seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição ou a de seu médico, se assim você desejar. Todos os



resultados obtidos serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua identidade.

Informamos que não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação no estudo e que você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Esclarecimentos a respeito da pesquisa poderão ser realizados através de contato com o pesquisador responsável, Dr Eduardo Pandolfi Passos, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ou através do telefone (51) 3359-8000. Alternativamente, é possível procurar a pesquisadora Dra Deborah Beltrami Gomez, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, telefone (51) 3359-8117. Em caso de dúvidas, é possível contatar o Comitê de Ética em Pesquisa, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo uma delas entregue a você e outra mantida pelo grupo de pesquisadores.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

### Anexo 3. Instrumento de Pesquisa

#### Instrumento de Pesquisa

Nome: \_\_\_\_\_

Data inclusão: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

Grupo de estudo:

( ) controle            ( ) inférteis

Idade: \_\_\_\_\_

Paridade: G \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ C \_\_\_\_\_ A \_\_\_\_\_

Se gestante:

- Idade gestacional: \_\_\_\_\_

Se infértil:

Tempo de infertilidade: \_\_\_\_\_ anos

Fator tubáreo            Não ( )    Sim ( )

Outro fator de infertilidade associado    Não ( )    Sim ( ) Qual? \_\_\_\_\_

Idade da sexarca \_\_\_\_\_ anos

Número de parceiros sexuais \_\_\_\_\_

Tem parceiro fixo Sim ( ) Não ( )

Usa preservativo regularmente Sim ( ) Não ( )

História de DIP Sim ( ) Não ( )

História de gestação ectópica Sim ( ) Não ( )

História de cirurgia pélvica Sim ( ) Não ( )

História de infecção por HPV Sim ( ) Não ( )

Tabagismo Sim ( ) Não ( )

Resultados:

Clamídia IgG negativo ( ) positivo ( ) Se positivo, titulação \_\_\_\_\_

PCR urina negativo ( ) positivo ( )