

MYCOPLASMA PNEUMONIAE: FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO EM GRUPOS ETÁRIOS DA POPULAÇÃO DA CAPITAL E DO INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO

Luis F. de SALLES GOMES (1), Sueko TAKIMOTO (2) e José Olavo de FREITAS Jr. (3)

RESUMO

Foi realizado inquérito sorológico na população da Capital e do Interior do Estado de São Paulo, visando demonstrar a presença de anticorpos contra *Mycoplasma pneumoniae*. De 492 soros submetidos à técnica de inibição da fermentação, 45,5% resultaram positivos. Houve diferença significante entre as duas populações estudadas. A tendência geral da frequência de soros positivos demonstrou correlação direta com o aumento da idade. Cerca de 50% da população estudada até os 14 anos de idade, já haviam sido infectados pelo *M. pneumoniae*.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, acumularam-se evidências de que parte ponderável das pneumonias não era devida a agentes bacterianos comuns. Alguns vírus, como o da influenza, adenovírus e respiratórios sincicial, assim como *Mycoplasma pneumoniae* foram considerados como as causas não bacterianas mais prováveis do comprometimento pulmonar.

O agente etiológico da pneumonia atípica primária foi descrito por EATON & col.⁵ em 1944 mas, somente em 1959, após os trabalhos de LIU & col.¹⁰ sobre a resposta sorológica à infecção, ficou estabelecida e completada a relação entre o agente e a resposta imunológica específica. Em 1963, CHANOCK & col.¹, após estudos etiológicos fundamentais propuseram o nome *Mycoplasma pneumoniae* para o agente causal da pneumonia atípica primária. Estudos clínico-epidemiológicos sobre a infecção demonstram que o quadro clínico pode variar desde uma infecção inaparente, uma simples afecção do trato respiratório superior, até o comprometimento do trato respiratório infe-

rior demonstrado, por evidência radiológica de pneumonia e broncopneumonia. A infecção afeta tanto crianças como adultos e representa, segundo alguns Autores, 35% das pneumonias verificadas no grupo etário de 5 a 19 anos em certas áreas dos Estados Unidos da América do Norte⁷. Outros Autores revelam incidências bem mais baixas dessa infecção, tais como 1 a 10% em crianças com quadro de pneumonia^{2, 8}.

Um estudo longitudinal durante 5 anos demonstrou que cerca de 70% das crianças apresentaram anticorpos contra *Mycoplasma pneumoniae* e, obviamente, concluíram os Autores que a infecção por este agente é uma das causas comuns de afecções do trato respiratório em crianças⁴.

Existem atualmente algumas provas sorológicas de fácil realização, capazes de evidenciar anticorpos específicos contra micoplasmas, tais como: fixação do complemento¹³, hemaglutinação indireta³ e inibição da redução do tetrazolium⁹. Em 1966, a prova da inibição da fermentação ou inibição do crescimento pela inibição da pro-

(1) Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

(2) Biologista do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

(3) Estagiário de Ciências Biomédicas da Escola Paulista de Medicina no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

dução de ácido, foi descrito por TAYLOR-ROBINSON & col.¹² baseado na característica dos micoplasmas de serem inibidos em seu crescimento pelo anticorpo específico e ainda no fato de que algumas espécies, durante o seu crescimento, serem acompanhados da produção de ácido. A incorporação de um indicador como o vermelho de fenol ao meio de crescimento possibilita a observação das mudanças de pH no caso de haver crescimento e formação de ácido. Ora, se adicionarmos anticorpos específicos ao meio, resultará inibição do crescimento do *Mycoplasma* e consequentemente não ocorrerá mudança do pH e, portanto, da cor do indicador.

Em revisão feita na literatura nacional não se encontrou qualquer referência a esta infecção, nem mesmo qualquer citação sobre o cultivo do *Mycoplasma pneumoniae* ou ainda, qualquer estudo sorológico da pneumonia atípica primária. É certo que alguns casos isolados têm sido detectados através de provas pouco específicas e menos sensíveis como a titulação das crioaglutininas.

Pelo fato de não ser conhecida em nosso país a frequência da pneumonia atípica primária é que foi realizado este trabalho, onde se apresentam os resultados obtidos através de inquérito sorológico em grupos etários da população da cidade de São Paulo e do interior do Estado. Apresentam-se ainda, considerações sobre o significado destes achados e particularidades a respeito do método laboratorial empregado.

MATERIAL E METODOS

População e amostras

A população estudada constou de indivíduos que procuravam os Centros de Saúde da capital e do interior do Estado de São Paulo, em linhas gerais desprovidos de recursos sócio-econômicos. Foram eliminados aqueles que vinham à procura de consultas queixando-se de qualquer sintoma de infecção em atividade. A maioria dos indivíduos estudados vinha à procura de vacinas ou atestados de saúde. Na capital, grande parte dos indivíduos estudados pertencia a Zona Leste da cidade, que engloba bairros dos mais va-

riados níveis sociais, enquanto que a população do interior era constituída pelos indivíduos que afluíam ao Posto de Saúde principal ou único da cidade.

Nos grupos etários, a distribuição da população quanto ao sexo foi a de 1 para 1. Entre os anos de 1963 a 1973, 500 amostras de sangue foram colhidas na capital e 500 no interior do Estado. Estas amostras foram numeradas e submetidas a sorteio e, ao redor de 40-50, foram escolhidas para representar cada grupo etário. As amostras foram colhidas com assepsia por punção venosa e, após retração do coágulo em temperatura ambiente, o soro era separado por centrifugação e conservado em congelador a -15°C até o momento do uso.

Mycoplasma pneumoniae

A amostra padrão do microrganismo usada neste inquérito foi a amostra "MAC" gentilmente cedida pelo Prof. E. A. Freundt, do WHO, International Reference Center for Animal Mycoplasma, Institute for Medical Microbiology, Dinamarca.

O soro-imune padrão foi gentilmente cedido pela Dra. M. S. Pereira, do Virus Reference Center Laboratory, Central Public Health Laboratory, Colindale, Londres, Grã-Bretanha.

O meio de cultura para manutenção do microrganismo foi o descrito por TAYLOR-ROBINSON & col.¹², o qual consiste, resumidamente, em sete partes do "PPLO Broth" Difco e duas partes de soro de cavalo não inativado, uma parte de extrato de levedura a 25%; 0,25 partes de acetado de talio a 1% p/v e 0,02 partes de penicilina G a 100 unidades por ml. Este meio, mais a adição de uma parte de glicose a 10% e 0,2 partes de vermelho de fenol a 0,2% com pH ajustado com HCl a 7,8, foi usado para o crescimento e fonte do *M. pneumoniae* para os testes de inibição do crescimento ou inibição da fermentação.

A técnica usada na prova de inibição do crescimento ou inibição da fermentação foi a descrita por TAYLOR-ROBINSON & col.¹². Pelo fato de não ser bastante divulgada em

nosso meio, passamos a descreve-la resumidamente.

Os testes foram realizados em placas permanentes de Lucite com orifícios em U, produzidas pela Cooke Engineering Company feitas especialmente para microtitulagens. Não foi realizado qualquer procedimento para descontaminação das placas antes do teste. O soro foi previamente inativado e usado em diluições duplas a partir do soro não diluído no meio já descrito. As diluições foram feitas no volume de 0,025 ml por meio de alças calibradas.

A suspensão de *M. pneumoniae* no mesmo meio, contendo dose apropriada e determinada mediante prévia titulação, foi adicionada no volume de 0,05 ml, completando-se com meio até 0,2 ml.

Os testemunhos da reação consistiram no controle de *M. pneumoniae* no mesmo volume utilizado para a reação, mais meio de cultivo suficiente para perfazer o volume total da reação.

Sempre foi introduzido um soro positivo controle padrão e um soro negativo. As placas eram seladas com fita colante tipo Durex de celofane e não agitadas. A seguir eram

incubadas a 35°C em estufa em condições de aerobiose.

As placas eram examinadas diariamente para observação da mudança do pH. O título final da reação foi considerado como a mais alta diluição do soro que impedia a mudança da cor.

RESULTADOS

De 492 soros examinados abrangendo variações de idade de 1 até 44 anos, obteve-se 219 ou 44,5% de soros considerados positivos por exibirem títulos iguais ou superiores a 1:1, isto é, a partir do soro não diluído.

A Tabela I informa separadamente por grupo etário os resultados obtidos na Capital e Interior do Estado de São Paulo, mostrando as frequências da infecção em estudo. No grupo etário de 1-4 anos da capital, observase a mais baixa frequência obtida, isto é, 29,4%, enquanto que, no grupo etário de 10-14 anos, obteve-se índice de 61,7% e 47,4% respectivamente para a Capital e Interior do Estado. A média destes dois últimos dados foi de 55,3% mostrando que até esta idade, parte ponderavel da população em estudo já foi infectada pelo *M. pneumoniae*.

TABELA I

Frequência de positividade da reação de inibição da fermentação por *Mycoplasma pneumoniae* em 492 soros de doadores da Capital e do Interior do Estado de São Paulo, por grupos etários

| Grupo etário (anos) | Capital | | | Interior | | | Capital + Interior | | |
|---------------------|-------------|-----------|------|-------------|-----------|------|--------------------|-----------|------|
| | N.º testado | Positivos | | N.º testado | Positivos | | N.º testado | Positivos | |
| | | N.º | % | | N.º | % | | N.º | % |
| 1-4 | 34 | 10 | 29,4 | 0 | | | 34 | 10 | 29,4 |
| 5-9 | 57 | 27 | 47,4 | 0 | | | 57 | 27 | 47,4 |
| 10-14 | 47 | 29 | 61,7 | 38 | 18 | 47,4 | 85 | 47 | 55,3 |
| 15-19 | 40 | 16 | 40,0 | 40 | 10 | 25,0 | 80 | 26 | 32,5 |
| 20-24 | 40 | 14 | 35,0 | 40 | 11 | 27,5 | 80 | 25 | 31,2 |
| 25-34 | 40 | 22 | 55,0 | 36 | 13 | 36,1 | 76 | 35 | 46,0 |
| 35-44 | 40 | 29 | 72,5 | 40 | 20 | 50,0 | 80 | 49 | 61,2 |
| Total | 298 | 147 | 49,3 | 194 | 72 | 37,1 | 492 | 219 | 44,5 |

A Tabela I informa ainda que os índices mais altos de positividade, tanto para a Capital como para o Interior do Estado, foram obtidos no grupo etário de idade mais avançada. A análise estatística dos dados constantes da tabela revelou diferença significativa pelo teste de χ^2 (Qui-Quadrado) com $p < 0,05$ permitindo, portanto, asseverar-se que a infecção pelo *M. pneumoniae* é significativamente mais freqüente na Capital que no Interior do Estado.

Foi ainda estudada a tendência geral dos resultados pelo método da regressão das proporções descrito por Cochran, que consiste em determinar a linha de regressão do fenômeno estudado a partir dos dados obtidos (Fig. 1). Este procedimento foi aplicado somente aos dados obtidos na capital. Desta análise, infere-se que a tendência geral dos resultados indica que o aumento do número de soros positivos está relacionado diretamente ao aumento da idade dos doadores.

Na Tabela II, são apresentados as recíprocas dos títulos obtidos com a reação de inibição do metabolismo, usada neste inquérito sorológico.

A Tabela III informa a distribuição dos títulos nos soros positivos.

DISCUSSÃO

A determinação de anticorpos para *Mycoplasma pneumoniae* pela técnica da inibição da fermentação usada neste inquérito sorológico é considerada como a mais específica e uma das mais sensíveis para esta finalidade. Acresce ainda que, é de fácil realização em comparação com as outras técnicas, como a de Imunofluorescência e a de inibição do crescimento de *Mycoplasma* pelo método do disco impregnado com o soro a ser examinado.

O fato de somente ser empregada em espécies de *Mycoplasma* que produzem ácido durante seu crescimento limita o emprego da técnica a poucas espécies. Segundo TAYLOR-ROBINSON¹², a técnica usada permite, dentro da heterogeneidade do gênero, ser considerada como extremamente sensível, não apresentando reações cruzadas como as obtidas com outros métodos, tais como a fixação do complemento e a inibição de hemaglutinação.

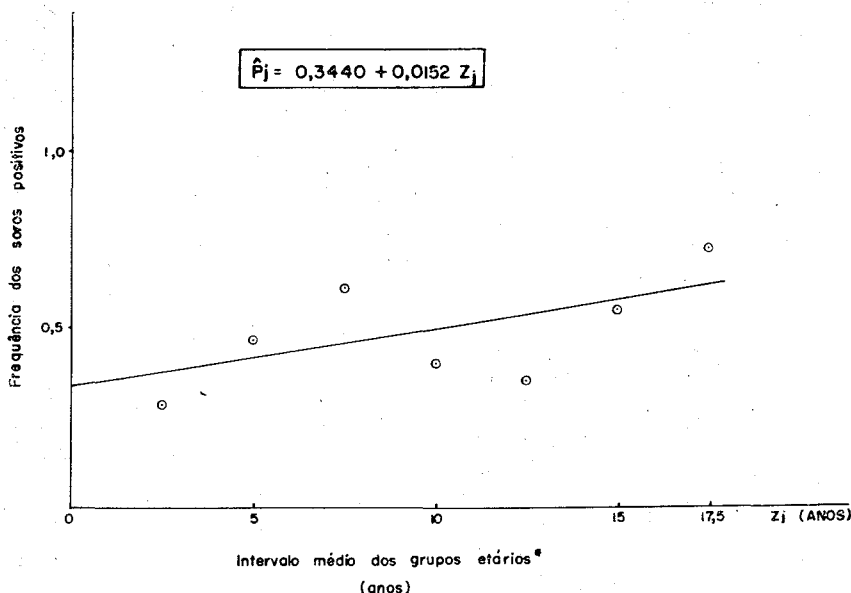


Fig. 1 — Diagrama e fórmula da regressão das frequências dos soros positivos sobre os intervalos médios dos grupos etários. Método de Cochran, W.G. — *Biometrics* 10:417, 1954.

TABELA II

Titulos da reação de inibição da fermentação por *Mycoplasma pneumoniae* em 219 soros positivos de doadores da Capital e do Interior do Estado de São Paulo, por grupo etário

| Grupo etário (anos) | Capital | | | | | Interior | | | | | | |
|---------------------|--------------|---------------------|----|----|---|--------------|---------------------|----|----|---|----|----|
| | N.º Positivo | Recíproca do título | | | | N.º Positivo | Recíproca do título | | | | | |
| | | 1 | 2 | 4 | 8 | | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| 1-4 | 10 | 3 | 2 | 5 | 0 | 0 | | | | | | |
| 5-9 | 27 | 6 | 8 | 11 | 2 | 0 | | | | | | |
| 10-14 | 29 | 3 | 8 | 18 | 0 | 18 | 5 | 5 | 7 | 1 | 0 | 0 |
| 15-19 | 16 | 7 | 9 | 0 | 0 | 10 | 2 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 20-24 | 14 | 6 | 6 | 1 | 1 | 11 | 4 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| 25-34 | 22 | 9 | 3 | 9 | 1 | 13 | 3 | 5 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 35-44 | 29 | 10 | 8 | 10 | 1 | 20 | 7 | 7 | 1 | 0 | 4 | 1 |
| Total | 147 | 44 | 44 | 54 | 5 | 72 | 21 | 26 | 17 | 3 | 4 | 1 |

TABELA III

Distribuição dos 219 soros positivos na reação de inibição da fermentação por *Mycoplasma pneumoniae*, obtidos no Estado de São Paulo

| | Recíproca do título | | | | | |
|-----------------|---------------------|------|------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| Número de soros | 65 | 70 | 71 | 8 | 4 | 1 |
| Porcentagem | 30,1 | 32,0 | 32,4 | 3,6 | 1,8 | 0,4 |

Poder-se-ia considerar estranha a inclusão, como positivos, dos soros reagentes na diluição 1:1, isto é, no soro não diluído. No entanto, uma verificação da literatura mostra que numerosos Autores adotam essa metodologia^{4, 11, 14}.

Ainda é de interesse acrescentar que os resultados obtidos com essa técnica não dependeriam da fase de infecção em que foi colhida a amostra, isto porque, no método usado, os anticorpos inibidores do metabolismo derivam das três classes de imunoglobulinas⁶, sendo, portanto, o método de preferência para qualquer inquérito sorológico, pois resulta em melhor avaliação da frequência de infecções.

Em vista destes argumentos não paira dúvida de que foram titulados somente anti-

corpos para *Mycoplasma pneumoniae* no presente estudo.

Os resultados obtidos neste inquérito não diferem, em geral, dos encontrados por outros Autores¹⁴, no entanto, diferem dos achados de outros¹¹ que asseveram ser a incidência desta infecção mais comum entre jovens e em indivíduos de idade mais avançada. Os presentes achados são coincidentes em relação à faixa etária de idade mais avançada. No entanto, a segunda maior frequência da infecção na Cidade e no Estado de São Paulo deu-se entre os 10-14 anos.

De fato, segundo os resultados do presente inquérito, verificou-se que a frequência da infecção é pequena em relação ao grupo etário de 1-4 anos, e ainda que, até os 14 anos,

parte ponderável da população já foi infectada pelo *Mycoplasma pneumoniae*. Caso nossos dados representem a situação real, mais de 50% da população da Capital e Interior já foram infectadas até os 14 anos de idade. Estes dois dados sugerem que a frequência de infecções aumenta em crianças na idade escolar. Isso está de acordo com os conhecimentos obtidos de outras infecções que permitem julgar que o ambiente escolar é a maior fonte de infecções para os aglomerados familiares.

Não há dúvida de que o resultado geral de 44,5% de soros com anticorpos contra *Mycoplasma pneumoniae*, sugere que existe alta frequência dessa infecção em nosso meio. Este dado geral praticamente reproduz os dados obtidos em inquéritos sorológicos onde foram usados vários métodos laboratoriais para detectar anticorpos contra o *Mycoplasma pneumoniae*, feitos em grupos etários de 3 meses a 60 anos de idade, nos quais, a frequência de anticorpos na população estudada foi de 43%¹⁴.

Em nossos dados, a análise estatística indicou que a frequência da infecção foi significativamente maior na Capital que no Interior do Estado. Ora, caso nossos dados representem a situação epidemiológica real, então essa diferença poderia ser explicada, de um lado, pelas maiores aglomerações humanas prevalentes na Capital e, por outro lado, pela possibilidade dos habitantes do Interior passarem a maior parte do dia ao ar livre. O estudo estatístico revelou ainda, que a tendência geral expressa nos resultados obtidos neste inquérito é consoante com a verificada no resto do mundo.

Em relação aos títulos obtidos no presente estudo, onde a grande maioria se distribui até a diluição de 1:4, não merece maior atenção porque sempre foi incluída nas reações um soro-padrão de título conhecido. Além do mais, em poucos casos clínicos de *Mycoplasma pneumoniae* estudados pelos Autores, com soros obtidos na fase aguda e na convalescença, os exames das amostras demonstraram aumento de mais de quatro vezes no título, porém, não ultrapassavam de 1:128.

Cabe frizar-se ainda, que este inquérito não foi desenvolvido no período de um sur-

to, portanto, os resultados expressam unicamente a situação epidemiológica prevalente no momento em que foi colhida a amostragem pesquisada.

S U M M A R Y

Mycoplasma pneumoniae: frequency of infection in the population of the City and the State of São Paulo, Brasil, according to age groups

A serological survey aimed at detection of antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* was conducted in the populations of the Capital and the rest of the State of São Paulo, Brasil. Of 492 sera tested by the fermentation inhibition technique, 45.5% were positive. A statistically significant difference between the two populations studied was found. A trend of increasing frequency of positive sera with increasing age was detected. About 50% of persons \leq 14-year old had been infected in each of the two study populations.

A G R A D E C I M E N T O

Os Autores agradecem ao Prof. Guilherme Rodrigues da Silva a orientação estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHANOCK, R.M.; DIENES, L.; EATON, M.D.; EDWARD, D.G.; FREUNDT, E.A.; HAYFLICK, L.; HERS, J.F.P.H.; JENSEN, K.E.; LIU, C.; MARMION, B.P.; MORTON, H.E.; MUFSON, M.A.; SMITH, P.F.; SOMERSON, N.L. & TAYLOR-ROBINSON, D. — *Mycoplasma pneumoniae* proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). *Science* 140:662, 1963.
2. CHANOCK, R.M.; COOK, M.K.; FOX, H. H.; PARROTT, R.H. & HUEBNER, R.J. — Serological evidence of infection with Eaton agent in lower respiratory illness in childhood. *New England J. Med.* 262:648-654, 1960.
3. DOWDLE, W.R. & ROBINSON, R.Q. — An indirect hemagglutination test for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116:947-950, 1964.

SALLES GOMES, L. F. de; TAKIMOTO, S. & FREITAS Jr., J. O. de — *Mycoplasma pneumoniae*: frequência da infecção em grupos etários da população da Capital e do Interior do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17:20-26, 1975.

4. DOWDLE, W.R.; STEWART, J.A.; HEYWARD, J.T. & ROBINSON, R.Q. — *Mycoplasma pneumoniae* infection in a children's population: a five years study. *Amer. J. Epidemiol.* 85:137-146, 1967.
5. EATON, M.D.; MEIKLEJOHN, G. & VAN HERICK, W. — Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. I — A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. *J. Exp. Med.* 79:648-668, 1944.
6. FERNALD, G.W.; CLYDE Jr., W.A. & DENNY, F.W. — Nature of immune response to *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Immunol.* 98:1028-1038, 1967.
7. GRAYSTON, J.T.; ALEXANDER, E.R.; KENNY, G.E.; CLARKE, E.R.; FREMONT, J.C. & MACCOLL, W.A. — *Mycoplasma pneumoniae* infections; clinical and epidemiological studies. *JAMA* 191:369-374, 1965.
8. HAYFLICK, L. & CHANOCK, R.M. — *Mycoplasma* species of man. *Bact. Rev.* 29:185-221, 1965.
9. JENSEN, K.E. — Antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* measured by inhibition of tetrazolium reduction. *Bact. Proc.* 70:71, 1964.
10. LIU, C.; EATON, M.D. & HEYL, J.T. — Studies on primary atypical pneumonia. II — Observations concerning the development and immunological characteristics of antibody in patients. *J. Exp. Med.* 109:545-556, 1959.
11. PURCEL, H. & CHANOCK, R.M. — *Mycoplasmas* of human origin. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. — *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infection*. 4 ed. New York, A.P.H.A., 1969, p. 786-825.
12. TAYLOR-ROBINSON, D.; PURCELL, R.H.; WONY, D.C. & CHANOCK, R.M. — A colour test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. *J. Hyg.* 64:91-104, 1966.
13. TAYLOR-ROBINSON, D.; SOMERSON, N. L.; TURNER, H.C. & CHANOCK, R.M. — Serological relationships among human mycoplasmas as shown by complement fixation and gel diffusion. *J. Bact.* 85:1261-1273, 1963.
14. TAYLOR-ROBINSON, D.; SHIRAI, A.; SOBESLAVSKY, O. & CHANOCK, R.M. — Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection. II — Significance measured by different techniques. *Amer. J. Epidemiol.* 84:301-313, 1966.

Recebido para publicação em 9/4/1974.