

ARTIGO ORIGINAL

Reporting detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in tissues of neonatal death cases[☆]

Maria Hernandez Trejo^{a,b}, Norma E. Herrera Gonzalez^b, Marcos R. Escobedo Guerra^c, M. de Jesus de Haro Cruz^c, Elsa R. Moreno-Verduzco^d, Marcela Lopez-Hurtado^e e Fernando M. Guerra-Infante^{c,e,*}

^a Departamento de Neurobiologia do Desenvolvimento, Instituto Nacional de Perinatologia, D.F., México

^b Escola de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, D.F., México

^c Escola Nacional de Ciências Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, D.F., México

^d Departamento de Anatomia Patológica, Instituto Nacional de Perinatologia, D.F., México

^e Departamento de Infectologia, Instituto Nacional de Perinatologia, D.F., México

Recebido em 21 de maio de 2013; aceito em 12 de agosto de 2013

KEYWORDS

Chlamydia trachomatis;
Polymerase chain reaction;
Newborn;
Sepsis;
Mortality

Abstract

Objective: to determine whether *C. trachomatis* was present in neonates with infection, but without an isolated pathogen, who died during the first week of life.

Methods: early neonatal death cases whose causes of death had been previously adjudicated by the institutional mortality committee were randomly selected. End-point and real-time poly-merase chain reaction of the *C. trachomatis omp1* gene was used to blindly identify the presence of chlamydial DNA in the paraffinized samples of five organs (from authorized autopsies) of each of the dead neonates. Additionally, differential diagnoses were conducted by amplifying a fragment of the 16S rRNA of *Mycoplasma spp.*

Results: in five cases (35.7%), *C. trachomatis* DNA was found in one or more organs. Severe neonatal infection was present in three cases; one of them corresponded to genotype D of *C. trachomatis*. Interestingly, another case fulfilled the same criteria but had a positive polymerase chain reaction for *Mycoplasma hominis*, a pathogen known to produce sepsis in newborns.

Conclusion: the use of molecular biology techniques in these cases of early infant mortality demonstrated that *C. trachomatis* could play a role in the development of severe infection and in early neonatal death, similarly to that observed with *Mycoplasma*

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.09.002>

[☆] Como citar este artigo: Hernandez-Trejo M, Herrera-Gonzalez NE, Escobedo-Guerra MR, de Haro-Cruz MJ, Moreno-Verduzco ER, Lopez-Hurtado M, et al. Reporting detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in tissues of neonatal death cases. J Pediatr (Rio J). 2014;90:182-9.

* Autor para correspondência.

E-mail: fguerra_96@yahoo.com (F.M. Guerra-Infante).

PALAVRAS-CHAVE

Chlamydia trachomatis;
 Reação em cadeia da polimerase;
 Recém-nascido;
 Sepsis;
 Mortalidade

hominis. Further study is required to determine the pathogenesis of this perinatal infection.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Relato de detecção de DNA de *Chlamydia trachomatis* em tecidos de casos de óbito neonatal

Resumo

Objetivo: determinar se a *C. trachomatis* está presente em neonatos com infecção, porém sem patógeno isolado, que morreram durante a primeira semana de vida.

Métodos: casos de óbito neonatal precoce cujas causas de óbito haviam sido anteriormente determinadas pelo Comitê de Mortalidade da instituição foram aleatoriamente selecionados. Foram utilizadas as reações em cadeia da polimerase convencional e em tempo real do gene *omp1* da *C. trachomatis*, para identificar, às cegas, a presença de DNA de clamídia nas amostras desparafinizadas de cinco órgãos (de autópsias autorizadas) de cada um dos neonatos mortos. Além disso, foram realizados diagnósticos diferenciais por amplificação de um fragmento do rRNA 16S de *Mycoplasma ssp*.

Resultados: em cinco casos (35,7%) a presença de DNA de *C. trachomatis* foi detectada em um ou mais órgãos. Havia infecção neonatal grave em três casos; um deles correspondente ao genótipo D de *C. trachomatis*. Curiosamente, outro caso preencheu os mesmos critérios, porém possuía uma reação em cadeia da polimerase positiva para *Mycoplasma hominis*, um patógeno conhecido por causar sepsis em recém-nascidos.

Conclusão: a utilização de técnicas de biologia molecular nos casos de mortalidade infantil precoce mostrou que a *C. trachomatis* poderia desempenhar um papel no desenvolvimento de infecção grave e no óbito neonatal precoce semelhante ao observado com a *Mycoplasma hominis*. São necessários estudos adicionais para determinar a patogênese dessa infecção perinatal.

© 2013 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Introdução

A mortalidade neonatal é parte da mortalidade infantil. Esta tem sido definida como óbito ocorrido nos primeiros 28 dias de vida, e está associada, principalmente, a infecções congênitas ou adquiridas após o nascimento. Essas infecções afetam fortemente as causas de óbito e aborto em países não industrializados.^{1,2} *Chlamydia trachomatis* é a causa de grande parte das infecções bacterianas sexualmente transmissíveis em todo o mundo.³ A prevalência da infecção por *C. trachomatis* durante a gravidez é variável: nos Estados Unidos, representa entre 2% e 13,7%; no Brasil, entre 2,7 e 10%⁴ e, no México, varia entre 4% e 28%.⁵ Ela está relacionada à ruptura prematura de membranas, corioamnionite, parto prematuro e desenvolvimento de oftalmia e pneumonia neonatal. Também está relacionada a altas taxas de baixo peso ao nascer e mortalidade perinatal.⁴ As manifestações clínicas variáveis apresentam tosse paroxística entrecortada, rinorreia prodromal e histórico de conjuntivite, taquipneia e febre. Os achados mais frequentes em radiografias de tórax são infiltrado intersticial dos campos pulmonares bilaterais, hiperinflação e atelectasia.⁶

O risco de transmissão vertical de *C. trachomatis* foi calculado entre 60% e 70%, e ocorre durante a passagem do bebê pelo canal do parto. Entretanto, há algumas evidências de que a transmissão vertical também possa ocorrer dentro do útero, pois os recém-nascidos por cesariana também se encontravam infectados e com membranas intactas.⁶⁻⁹

Recentemente, Rours et al.¹⁰ demonstraram a presença do DNA de clamídia na placenta de prematuros e encontraram uma associação do DNA com o grau e progresso de inflamação tecidual. Atualmente, não há um bom modelo experimental disponível para infecções por *Chlamydia* durante a gravidez que forneceria conhecimento dos efeitos da *Chlamydia* sobre a gravidez e sua associação com óbito neonatal.

Além dos tecidos pulmonar e conjuntivo de recém-nascidos, também foi encontrada *Chlamydia* nos tecidos dos sistemas intestinal, geniturinário, do miocárdio e nervoso.¹¹⁻¹³ A presença de *Chlamydia* nesses outros tecidos sugere que ela possui uma capacidade invasiva. O presente estudo visou detectar o DNA de clamídia em diferentes tecidos de neonatos diagnosticados com “infecção sem um patógeno isolado” e que vieram a óbito durante a primeira semana de vida. Estudamos, também, neonatos cuja causa evidente de óbito não foi infecciosa. Adicionalmente, buscamos identificar os genótipos de *Chlamydia* envolvidos nesses neonatos que desenvolveram infecção precoce.

Métodos

Declaração de ética

O protocolo deste estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Medicina no Instituto Politécnico Nacional, na Cidade do México.

Definições

Infecção

Infecção neonatal grave foi estabelecida da seguinte forma: a) pelo achado de fragmentos do gene *omp1* da *C. trachomatis* em dois ou mais órgãos diferentes; b) possuindo dados clínicos e laboratoriais compatíveis com infecção no neonato durante sua vida; c) se a mãe apresentava antecedentes de risco de infecção; e d) um diagnóstico histopatológico de corioamnionite placentária e pneumonite no cadáver.

Ruptura prematura de membranas (RPM). Ruptura das membranas fetais antes do início do parto, independentemente da idade gestacional.¹⁴

Óbito neonatal precoce. Óbito antes do 7º dia de vida extrauterina.¹⁵

Critérios de inclusão

Disponibilidade de todos os órgãos, amostras e relatos selecionados. Análise atualizada pelo Comitê de Mortalidade Perinatal com resolução definitiva. Registros completos.

Seleção de amostras para autópsia

Foi realizada uma seleção aleatória de 20% dos casos de óbitos neonatais precoces entre 1º de janeiro e 31 de dezembro de 2003 que atenderam aos critérios de inclusão. Os casos foram separados em dois grupos, de acordo com o julgamento ou diagnóstico definitivo do Comitê de Mortalidade Perinatal da instituição. O Grupo 1 consistiu de diversos casos de óbito devido à infecção sistêmica,¹⁶ sem identificação de patógeno. O Grupo 2 foi formado por casos de óbito devido a qualquer outra causa não associada à infecção.

Localizamos os órgãos para autópsia, especificamente pulmões, rins, cérebro, fígado e brônquios, que foram preservados em blocos de parafina, em todos os casos participantes. O estudo incluiu apenas os casos em que todos esses órgãos se encontravam disponíveis, bem como registros clínicos materno e neonatal completos e estudos histopatológicos da autópsia e da placenta. O patologista responsável reavaliou, às cegas, as amostras histológicas dos cadáveres.

As placentas normalmente são analisadas de forma rotineira: os cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina foram investigados para deciduíte, vasculite, endometrite ou corioamnionite sem estudos especiais. Posteriormente, todo o material foi descartado. Por esse motivo, foram incluídos apenas os resultados do único estudo da placenta.

O restante dos blocos foi desparafinado e processado para extração de DNA. Todos os testes foram realizados às cegas. Os dados clínicos e demográficos foram obtidos de prontuários.

Extração do DNA

As amostras de tecido foram desparafinizadas com xilol, em temperatura ambiente, e lavadas com etanol. O tecido obtido foi então tratado com proteinase K, e o DNA foi obtido pela técnica de fenol-clorofórmio-isoamílico e precipitação com etanol, conforme descrito anteriormente.¹⁷

Detecção de *Chlamydia trachomatis*

Foram realizadas a reação em cadeia da polimerase convencional e a reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando o sistema PTC-100 (*MJ Research, Inc.*, Waltham, MA, EUA) e o sistema *StepOne* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, CA, EUA), respectivamente. Os iniciadores utilizados para a reação em cadeia da polimerase convencional são os preparados por Dutilh et al.¹⁸ e a amplificação de um fragmento do gene *omp1* da *C. trachomatis* (5'-GCCGCTTTGAGT TCTGCTTCCTC-3'; 5'-CCAAGTGGTGCA AGGATCGCA-3').

Cada reação em cadeia da polimerase convencional continha MgCl₂ a 1,75 mM, dNTPs a 0,2 mM, 25 pM de cada iniciador proposto, 2,5 U de Taq polimerase (GoTaq® Flexi DNA polimerase Promega®, Madison, WI, EUA) e 5 µl da amostra do DNA para um volume final de 25 µl. A mistura da reação foi incubada por cinco minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de um minuto a 95°C para desnaturação, um minuto a 59°C para alinhamento e um minuto a 70°C para extensão, e uma etapa final de alongamento de 5 minutos a 70°C. A amostra foi considerada positiva quando obtido um produto da amplificação de 129 bp.

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando: 3 mM de MgCl₂ a 2,7 mM, 25 pM de cada iniciador proposto, 2,5 U de Taq polimerase (*Applied Biosystems*), e 5 µl da amostra de DNA para um volume final de 25 µl. Os iniciadores utilizados foram projetados pelo programa *Primer Express 3.0 Sequence* (*Applied Biosystems*), a região amplificada fica dentro do mesmo amplicon de 129 bp obtido com os iniciadores DutilhFw: 5'-CCTGCTGAACCAAGC CTTATG-3' e Rv: 5'-AGGATCTC CGCCGAAACC-3'; sonda: 5'-TCGACGGAATTC TGT-3'. A mistura da reação foi preaquecida a 95°C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C.

Amplificação e detecção de *Mycoplasma ssp.* para diagnósticos diferenciais

A reação em cadeia da polimerase convencional foi realizada de acordo com o protocolo proposto por van Kuppevel et al.¹⁹ Os iniciadores utilizados foram: MGSO: 5'-GCACCATCTGTCACTCTGTTA ACCTC-3' e GPO-1: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'. Cada reação em cadeia da polimerase continha iniciadores de 20 pM/µl, dNTPs a 10 µM/µl, MgCl₂ a 2 mM/µl, Taq polimerase de 5 U/µl, 3 µl de DNA e 43 µl de água para um volume final de 50 µl. A mistura da reação foi incubada a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, alinhamento a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por cinco minutos. Uma amostra foi considerada positiva se um produto de 715 bp tivesse sido amplificado.

Para detectar as espécies, os seguintes iniciadores foram utilizados com o mesmo protocolo de reação em cadeia da polimerase: Mychomp (5'-ATACATGCATGTGCGAGCGAG-3') e Mychomn (5'-CATCTT TTAGTGGCGCCTTAC-3'). Adicionalmente, *M. hominis* foi detectado, segundo Grau et al.,²⁰ e *U. urealyticum* foi detectado, segundo Blanchard et al.,²¹ com os iniciadores

U5 (5'-CAATCT GCTCGTGAAGTATTAC-3') e U4 (5'-ACGACGTC CATAAGCAACT-3').

Análise do RFLP

Foi realizada uma análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) utilizando um método descrito anteriormente⁵ para genotipar as amostras com amplicons de 129 bp. Resumidamente, foi amplificado um fragmento de 1142 bp do gene *omp1* da *C. trachomatis*. Os iniciadores utilizados para amplificação foram os mesmos que os relatados por Yang et al.²²: OMP1 (5'-GCCGCTTTG AGTTCTGCTTCCTC-3') e OMP2 (5'-ATTTACGTGAGCAGCTCTCTCAT-3'). Amostras positivas para amplicon de 1142 bp foram submetidas a uma segunda reação em cadeia da polimerase, que gerou um fragmento de 879 bp. Os iniciadores utilizados também foram descritos por Yang et al.²²: P3 (5'-TGACTTTGTTTTCGA CCGTGT-3') e P4 (5'-TTTTCTAGATTCATCTTGTTCAAT/CTG-3'). O fragmento de 879 bp foi então incubado com *Alu1* endonuclease (Invitrogen, *Applied Biosystems*) por 10 horas a 37°C. O padrão de bandas resultante foi comparado ao da cepa correspondente. Neste estudo foi uW-3Cx (ATCC VR-885D).

Resultados

Dos 73 casos disponíveis, 18 foram escolhidos aleatoriamente. Contudo, não foi possível localizar todos os órgãos de interesse em três casos, e os resultados do estudo da placenta não estavam disponíveis para um caso. A tabela 1 descreve os resultados dos 14 casos de mortalidade infantil estudados, as características perinatais dos recém-nascidos e os dados maternos mais relevantes. Quatro casos atenderam aos critérios de infecção ou infecção sistêmica neonatal (casos 1, 3, 4 e 8). Os casos 1 e 8 foram negativos para culturas bacterianas e fúngicas realizadas durante a vida ou após a morte. No primeiro dia de vida, no caso 3, *Staphylococcus haemolyticus* foi isolado por meio de hemocultura. No caso 4, o recém-nascido sobreviveu apenas uma hora, e não foram realizadas culturas microbiológicas correspondentes.

A busca intencional pelo DNA de *Mycoplasma* e *Chlamydia* nos tecidos *post-mortem* utilizando a reação em cadeia da polimerase resultou na amplificação do gene *omp1* da *C. trachomatis* de 129 bp em cinco neonatos. Ele foi amplificado em dois ou mais órgãos nos casos 1, 2, 3 e 4, e apenas no rim, no caso 6. No caso 8, um produto de 715 bp, correspondendo a *Mycoplasma*, foi amplificado em tecidos do pulmão e do rim (imagem não mostrada).

DNA de clamídia foi encontrado em tecidos dos casos 2 e 9, porém, sem correlação clínica ou histopatológica indicando infecção. Esses casos apenas apresentaram prematuridade, barotrauma e hemorragia pulmonar. Adicionalmente, a amplificação dos fragmentos 1142 bp e 879 bp na análise do RFLP de amostras positivas para DNA de clamídia foi atingida apenas nos casos 1, 3 e 4 (fig. 1). A análise do RFLP das amostras, quando a amplificação do fragmento 879 bp foi obtida, apenas possibilitou a identificação do genótipo D da *C. trachomatis* (caso 1; fig. 2). Nos casos 2 e 6 não foi possível amplificar o fragmento 1142 bp, e foi confirmada a presença de DNA de clamídia no tecido do fígado, por meio

da reação em cadeia da polimerase em tempo real, apenas no caso 2 (imagem não mostrada).

Todos os casos foram intubados por via endotraqueal e receberam suporte ventilatório durante o período de vida. Foram encontrados seis casos de ruptura prematura de membranas. Dentre eles, foi comprovado DNA de clamídia em dois neonatos (casos 1 e 3), e os mesmos permaneceram *in utero* com a ruptura das membranas por oito a seis dias, respectivamente. As características clínicas de todos os casos podem ser vistas na tabela 2.

As causas de óbito nos casos restantes (casos 5 a 7 e 9 a 14) não foram associadas à infecção: quatro (29%) vieram a óbito devido a causas relacionadas ao nascimento prematuro; três (21%) devido a anomalias congênicas estruturais não compatíveis com vida; um devido à *hydrops fetalis* de origem não imunológica com pré-eclâmpsia grave; e um devido à isoimunização materno-fetal pelo Rh. Todos esses casos apresentaram resultados negativos da reação em cadeia da polimerase para *C. trachomatis* e *Mycoplasma spp*, com exceção do caso 6, mencionado anteriormente.

Discussão

As infecções graves ainda são a principal causa de morbimortalidade neonatal em regiões em desenvolvimento. Dentre os casos de mortalidade infantil, $\frac{3}{4}$ ocorrem durante a primeira semana de vida e, em muitos casos, a causa do óbito permanece desconhecida.²³

Infecção por clamídia na fase perinatal e neonatal pode produzir várias doenças, incluindo conjuntivite, nasofaringite, pneumonite e, com menos frequência, rinite, otite do ouvido médio, miocardite e encefalite.⁴ Contudo, a descoberta de resíduos genéticos dessa bactéria intracelular em tecidos orgânicos é bem rara na literatura médica.²⁴ Neste estudo, foi encontrado DNA de clamídia em mais de dois órgãos em quatro casos (casos 1, 2, 3 e 4), o que sugere o potencial de infecção multivisceral por esse patógeno. Um desses casos foi o 2, no qual o neonato nasceu prematuramente por cesariana e veio a óbito devido à extensão do pneumotórax. O caso 2 não apresentou dados histopatológicos de inflamação nos pulmões ou na placenta; contudo, a repetição do achado de DNA de clamídia no cérebro e fígado desse recém-nascido mostra uma forte suspeita de infecção sistêmica por *C. trachomatis*. Devido à falta de determinação dos critérios histopatológicos, esse caso sugere que todo o espectro da patogênese por *C. trachomatis* ainda não é completamente conhecido.

Em momento algum foram realizados estudos de diagnóstico com relação à infecção por *Chlamydia* ou *Mycoplasma* nesses pacientes. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao curto período de vida. Da mesma forma, as mães não foram testadas para patógenos atípicos durante a gravidez. A ausência de estudos sobre a infecção por *C. trachomatis* nessas mulheres ocorreu, provavelmente, em virtude do baixo ou nenhum controle médico durante a gestação: seis (43%) mulheres não fizeram controle médico, cinco (36%) passaram por apenas duas ou três consultas, e três (21%) passaram por cinco e seis consultas pré-natais.

A causa de óbito no caso 8 dessa série correspondeu a uma infecção sistêmica por *Mycoplasma hominis*. Ficou evi-

Tabela 1 Correlações e resultados clínicos e patológicos de RCP de *Chlamydia trachomatis* (omp1) em amostras desparafinizadas de cérebro, fígado, rim, pulmão e brônquios. Óbitos neonatais precoces

Caso	Fator de risco materno	Diagnóstico da autópsia	Diagnóstico da placenta	Resultados das culturas de bactérias	RCP	Diagnóstico anterior ^a	Novo diagnóstico
1	RPM 8 dias	Pneumonia congênita	Corioamnionite	Todos negativos	<i>C. trachomatis</i> no fígado, cérebro e brônquios	Sepse neonatal por AED	Infecção por <i>C. trachomatis</i>
2	Parto prematuro Natimorto anterior	Pneumotórax moderada, 40% de atelectasia	Normal	FCE PM <i>P rettgeri</i> + <i>E gergoviae</i>	<i>C. trachomatis</i> no fígado e cérebro e RCP Convencional no fígado	Pneumotórax	Infecção provável por <i>C. trachomatis</i>
3	RPM 6 dias	Pneumonia aguda, membrana hialina	Corioamnionite	1º dia: <i>S haemolyticus</i> de hemocultura 3º dia: FCE e hemocultura negativa	<i>C. trachomatis</i> no fígado, rim e cérebro	Sepse neonatal por AED	Infecção por <i>C. trachomatis</i>
4	RPM 26 horas Obstrução anterior do tubo, aborto e natimorto	Pneumonia congênita grave	Corioamnionite necrosante. Funisite	NR	<i>C. trachomatis</i> no fígado e brônquios	Sepse neonatal por AED	Infecção por <i>C. trachomatis</i>
5	Aborto anterior	Múltiplos defeitos estruturais importantes	Pequena	Todos negativos	Todos negativos	Múltiplos defeitos estruturais congênitos	Múltiplos defeitos estruturais congênitos
6	Nenhum	Agenesia renal direita Hemorragia pulmonar	Normal	NR	<i>C. trachomatis</i> no rim	Hemorragia pulmonar surfactante	Complicações de prematuridade
7	RPM 26 horas	33% da Membrana hialina 70% de atelectasia	Normal	Todos negativos	Todos negativos	Membrana hialina Hipertensão pulmonar	Complicações de prematuridade
8	RPM 8 horas	Pneumonia congênita	Corioamnionite e funisite graves	Todos negativos	<i>Mycoplasma hominis</i> no pulmão e no rim	Sepse neonatal congênita por AED	Infecção por <i>Mycoplasma hominis</i>
9	Não	<i>Hydrops fetalis</i>	Sinais de hipóxia	Hemocultura: <i>Staphylococcus</i> spp. Todos os outros, negativos	Todos negativos	<i>Hydrops fetalis</i> não imune	<i>Hydrops fetalis</i> não imune
10	Aborto anterior	Imaturidade sistêmica	Normal	NR	Todos negativos	Imaturidade Trauma obstétrico	Prematuridade extrema
11	Dois natimortos anteriores e um caso de mortalidade infantil	Eritroblastose Enfisema pulmonar	Eritroblastose	Todos negativos	Todos negativos	<i>Hydrops fetalis</i> de isoimunização Rh	<i>Hydrops fetalis</i> de isoimunização Rh
12	RPM 1 hora	Múltiplos defeitos estruturais importantes	Normal	Todos negativos	Todos negativos	Múltiplos defeitos estruturais importantes	Múltiplos defeitos estruturais importantes
13	Nenhum	Imaturidade	Subcorionite e deciduíte leves	NR	Todos negativos	Imaturidade	Prematuridade extrema
14	Mortalidade infantil	Displasia tanatofórica	Normal	NR	Todos negativos	Displasia óssea grave	Displasia óssea grave

CT, *Chlamydia trachomatis*; FCE, fluido cerebrospinal; PM, post-mortem; RPM, Ruptura Prematura de Membranas (18); NR, não realizadas; AED; agente etiológico desconhecido; PCR, reação em cadeia da polimerase.

^a Determinado pelo Comitê de Mortalidade Perinatal.

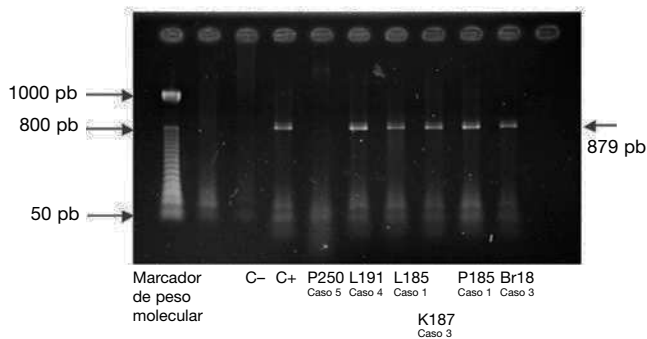


Figura 1 RC de fragmento de 879 bp do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis*.

Amostras desparafinizadas de órgãos da autópsia. F, fígado; P, pulmões; R, rins; C, cérebro; C-, Controle negativo; C+, Controle positivo. (Números pertencentes à classificação institucional de casos.)

denciado que esse patógeno produz infecções graves em fetos e recém-nascidos, e que pode ser transmitido verticalmente. Dentre as infecções causadas por *Mycoplasma hominis* destacam-se pneumonia, que evolui rapidamente para displasia broncopulmonar, e infecções sistêmicas com prognósticos ruins, caso não detectadas e tratadas a tempo.²⁵ Essa situação também pode ocorrer com as infecções causadas por *C. trachomatis*.

A reação em cadeia da polimerase é o método mais sensível e rápido para detectar patógenos microbianos em espécimes clínicos, em especial, a *Chlamydia* e o *Mycoplasma*, que de difícil cultivo *in vitro*. A aplicação desse método em espécimes clínicos possui várias possíveis armadilhas devido à presença de inibidores e contaminação. Além disso, a sensibilidade e especificidade deste ensaio dependem dos genes-alvo, das sequências dos iniciadores, das técnicas utilizadas, dos procedimentos de extração do DNA e dos métodos de detecção do produto amplificado. Contudo, nosso grupo de investigação padronizou a reação em cadeia da polimerase aplicada anteriormente neste estudo.²⁴ Além disso, as amostras positivas no ensaio foram confirmadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real, e esse método oferece várias vantagens técnicas gerais, incluindo probabilidades reduzidas de variabilidade e contaminação, bem como monitoramento on-line, e não há necessidade de análises pós-reação.

Atualmente, nossa capacidade de detectar infecções como *C. trachomatis*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (infecções que afetam a saúde das populações mais vulneráveis: recém-nascidos e mulheres grávidas) nos permitirá identificar a alta frequência por meio da qual esses micro-organismos produzem rupturas de membranas, nascimentos prematuros e doenças neonatais que podem se tornar graves, e até mesmo fatais.⁶ Portanto, acreditamos que no futuro será necessário reavaliar as políticas públicas de atendimento pré-natal.

Nesta série, cinco de 14 casos receberam tratamento antimicrobiano empírico. O esquema antibiótico administrado em dois dos recém-nascidos que vieram a óbito com infecções sistêmicas por *C. trachomatis* (casos 1 e 3) consistiu de aminoglicosídeos e beta-lactâmicos, tratamento normalmente utilizado quando há suspeita de infecção congênita, pois ele abrange quase todas as possibilidades etiológicas de infecção neonatal adquirida *in utero*.²⁶ Contudo,

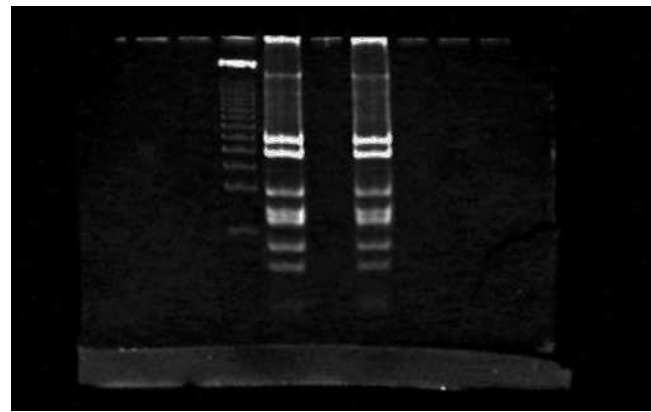


Figura 2 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP). Genótipo D do gene *omp1* de *Chlamydia trachomatis*. Amostra: fígado do caso 1. Padrão da cepa: *Chlamydia trachomatis* UW-3/Cx (ATCC VR 885D). O produto de 879 bp foi restrito com Alu I. M, Marcador de peso molecular.

os gêneros *Chlamydia* e *Mycoplasma* não estão incluídos em seu espectro antimicrobiano.²⁷ A profilaxia ocular pode não conseguir prevenir conjuntivite neonatal por clamídia, assim como não impede colonização ou infecção nos pulmões; o único meio de prevenir infecção por clamídia em recém-nascidos é o tratamento das mães infectadas.

O caso 1 não apresentou desenvolvimento de bactérias ou fungos nas culturas realizadas, e o caso 2 foi classificado como contaminado, pois a amostra do fluido cefalorraquidiano foi obtida após o óbito, e desenvolveu as espécies polimicrobianas *Providencia rettgeri* e *Enterobacter gergoviae*, que não são conhecidas como produtoras de infecções neonatais. O caso 3 foi uma cesariana com seis dias de ruptura prematura das membranas e corioamnionite materna. No nascimento, foi obtida uma amostra de sangue do cordão umbilical, que mostrou o desenvolvimento da bactéria *Staphylococcus haemolyticus*. Essa bactéria faz parte da flora cutânea e não é um patógeno que produz infecções neonatais congênitas.²⁸ Além disso, o tratamento com ampicilina e amicacina não abrange *Staphylococcus haemolyticus*, sendo caracteristicamente multirresistente. Essas premissas dão base à nossa conclusão de que essas amostras foram contaminadas.

Os sorotipos da *C. trachomatis* com capacidade invasiva elevada podem infestar diversos tecidos de indivíduos adultos e causar linfogranuloma (L1, L2, L2a e L3). Neste estudo, mostramos que a infecção por *C. trachomatis*, no caso 1, ocorreu em virtude do genótipo D, que é um dos sorotipos com prevalência mais elevada em todo o mundo nas infecções do trato geniturinário da população sexualmente ativa.²⁷ O genótipo D é um dos poucos sorotipos de *C. trachomatis* com uma citotoxina que possui grande homologia com a família de citotoxinas amplas (LCTs) produzidas por *Clostridium difficile*. Essas LCTs causam diversos efeitos citopáticos nas células hospedeiras, pois sua atividade de glicosiltransferase modifica as moléculas reguladoras intracelulares, como a de ligação ao GTP da superfamília Ras.²⁹ Adicionalmente, as LCTs, de maneira geral, interferem na organização e na dinâmica da actina no citoesqueleto e no tráfego intracelular.³⁰ O efeito citopático produzido pela citotoxina do sorotipo D de *C. trachomatis* resulta no arre-

Tabela 2 Características clínicas (mãe e filho) dos casos de mortalidade infantil

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9	Caso 10	Caso 11	Caso 12	Caso 13	Caso 14
Idade	3d 7h 12m	42m	2d 1h 47m	1h 2m	5d 20h 5m	3h 1m	1d 20h 48m	1d 12h 46m	1d 2h 45m	20m	18h	5d 19m	41m	1h 20m
Idade da mãe (anos)	33	28	30	35	26	26	15	23	36	23	30	27	18	23
Duração da RPM	8d	0	6d	26h	0	0	1d 2h	8h	0	0	0	1h	0	0
Parto	C	C	C	PE	C	C	C	PE	C	PE	C	C	PE	PD
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Feminino	Feminino
Apgar após 1 e 5 minutos	2-5	5-4	3-7	1-2	7-8	4-7	4-9	4-8	4-8	0-1	3-7	8-9	1-1	1-1
Peso (g)	590	1050	740	710	2000	910	1840	750	850	520	1290	2350	890	1480
Altura (cm)	29	37	33	34	44	33	43	36	31,5	30	38	45	34	32
Idade gestacional (semanas)	25	29	27	26	41	26	32	25	27	25	27	32	25	31
Diagnóstico materno	Hipo	PP	RPM Co	RPM Co	RCI	ITU Co	RPM	RPM Co	Pré-eclâm Grave	PP ITU	Isoim	<i>Hydrops</i>		
<i>fetalis</i>	PP	PP												
Tratamento neonatal com antibióticos	Ampi Dicloxa Amica	- -	Ampi -	- -	-	-	Ampi	Ampi	-	-				
Crescimento por idade gestacional	PIG	AIG	PIG	AIG	PIG	AIG	AIG	AIG	AIG	PIG	AIG	GIG	AIG	AIG

Co, corioamnionite; Isoim, isoimunização; RPM, ruptura prematura de membranas; Pré-eclâm, pré-eclâmpsia; Hipo, hipotireoidismo; ITU, infecção do trato urinário; RCI, retardamento do crescimento intrauterino; PIG, pequeno para a idade gestacional; AIG, adequado para a idade gestacional; GIG, grande para a idade gestacional; C, cesariana; PE, parto eutócico; PD, parto distócico; PP, parto prematuro; Ampí, ampicilina; Amica, amicacina; Dicloxa, dicloxacilina; d, dias; h, horas; m, minutos.

dondamento das células infectadas devido à despolimerização da actina. Isso pode ajudar a explicar, em parte, a capacidade de o sorotipo D infectar e disseminar vários órgãos nesses recém-nascidos nos quais foi encontrado DNA de clamídia. Contudo, os mecanismos pelos quais a infecção por *C. trachomatis* é disseminada em diferentes órgãos ainda devem ser identificados.

Este estudo apresenta a possibilidade de infecção por *C. trachomatis* em vários órgãos de fetos e recém-nascidos, o que pode estar associado à mortalidade infantil. Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar esse achado.

O achado de DNA de clamídia em mais de um órgão de autópsia pode não ser a forma mais aceita para diagnosticar infecção sistêmica ou estabelecer a causa de óbito. Contudo, em nossa opinião, a descoberta de três sequências diferentes do DNA de *C. trachomatis* por meio de reação em cadeia da polimerase convencional e em tempo real e a identificação em um caso do genótipo *C. trachomatis* envolvido fornecem uma comprovação suficiente para investigações futuras utilizando melhores recursos adicionais. A imuno-histoquímica fortaleceria a comprovação apresentada neste estudo, porém, infelizmente não pudemos realizar imuno-histoquímica em nossas amostras.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Lawn JE, Kerber K, Enweronu-Laryea C, Massee Bateman O. Newborn survival in low resource settings - are we delivering? *BJOG*. 2009;116:49-59.
- Borghesi A, Tziialla C, Decembrino L, Manzoni P, Stronati M. New possibilities of prevention of infection in the newborn. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24:28-30.
- Sturm-Ramirez K, Brumblay H, Diop K, Guèye-Ndiaye A, Sankalé JL, Thior I, et al. Molecular epidemiology of genital Chlamydia trachomatis infection in high-risk women in Senegal West Africa. *J Clin Microbiol*. 2000;38:138-45.
- Silva MJ, Florêncio GL, Gabiatti JR, Amaral RL, Eleutério Júnior J, Gonçalves AK. Perinatal morbidity and mortality associated with chlamydial infection: a meta-analysis study. *Braz J Infect Dis*. 2011;15:533-9.
- de Jesús De Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, et al. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2011;29:102-8.
- Souza EL, Girão RS, Simões JM, Reis CF, Galvão NA, Andrade SC, et al. Chlamydia trachomatis: a major agent of respiratory infections in infants from low-income families. *J Pediatr (RioJ)*. 2012;88:423-9.
- Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcomes in women infected with Chlamydia trachomatis: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect*. 2007;83:314-8.
- Hammerschlag MR. Chlamydia trachomatis in children. *Pediatr Ann*. 1994;23:349-53.
- Shariat H, Young M, Abedin M. An interesting case presentation: a possible new route for perinatal acquisition of Chlamydia. *J Perinatol*. 1992;12:300-2.
- Rours GI, de Krijger RR, Ott A, Willemsse HF, de Groot R, Zimmermann LJ, et al. Chlamydia trachomatis and placental inflammation in early preterm delivery. *Eur J Epidemiol*. 2011;26:421-8.
- Schachter J, Grossman M, Holt J, Sweet R, Spector S. Infection with Chlamydia trachomatis: involvement of multiple anatomic sites in neonates. *J Infect Dis*. 1979;139:232-4.
- Numazaki K, Wainberg MA, McDonald J. Chlamydia trachomatis infections in infants. *CMAJ*. 1989;140:615-22.
- Bertsche A, Wagner MH, Bollmann R, Obladen M, Felderhoff-Mueser U. An unusual manifestation of a neonatal Chlamydia infection. *J Child Neurol*. 2008;23:948-9.
- Caughey AB, Robinson JN, Norwitz ER. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Rev Obstet Gynecol*. 2008;1:11-22.
- Luo ZC, Karlberg J. Timing of birth and infant and early neonatal mortality in Sweden 1973-95: longitudinal birth register study. *BMJ*. 2001;323:1327-30.
- Nizet V, Klein JO. Bacterial sepsis and meningitis. Em: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, Nizet V, Maldonado YA, editores. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011. p. 222-75.
- Fraga-Nodarse J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Rev Cubana Med Trop*. 2004;56:208-13.
- Dutilh B, Bébéar C, Rodríguez P, Vekris A, Bonnet J, Garret M. Specific amplification of a DNA sequence common to all Chlamydia trachomatis serovars using the polymerase chain reaction. *Res Microbiol*. 1989;140:7-16.
- van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:2606-15.
- Grau O, Kovacic R, Griffais R, Launay V, Montagnier L. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species Mycoplasma penetrans and M. hominis. *Mol Cell Probes*. 1994;8:139-47.
- Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis*. 1993;17:S148-53.
- Yang CL, Maclean I, Brunham RC. DNA sequence polymorphism of the Chlamydia trachomatis omp1 gene. *J Infect Dis*. 1993;168:1225-30.
- Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010;375:1969-87.
- Hernández-Trejo M, López-Hurtado M, Flores-Medina S, de Haro-Cruz MJ, Guerra-Infante FM. Uncommon cause of late neonatal death with refractory respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr*. 2007;96:139-40.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:757-89.
- Darmstadt GL, Batra M, Zaidi AK. Parenteral antibiotics for the treatment of serious neonatal bacterial infections in developing country settings. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:S37-42.
- Workowski KA, Berman SM. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recomm Rep*. 2006;55:1-94.
- Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkrantz RA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002;347:240-7.
- Belland RJ, Scidmore MA, Crane DD, Hogan DM, Whitmire W, McClarty G, et al. Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13984-9.
- Lerm M, Schmidt G, Aktories K. Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;188:1-6.