



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

RAIMUNDA MARQUES DE CARVALHO

**DETECÇÃO LABORATORIAL DE *Chlamydia trachomatis* EM ESCOLARES DA REDE
PÚBLICA DO ESTADO DO PARÁ COM DIAGNOSTICO CLÍNICO DE TRACOMA**

BELÉM

2012

RAIMUNDA MARQUES DE CARVALHO

DETECÇÃO LABORATORIAL DE *Chlamydia trachomatis* EM ESCOLARES DA REDE PÚBLICA DO ESTADO DO PARÁ COM DIAGNOSTICO CLÍNICO DE TRACOMA

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Maísa Silva de Sousa, Dr.

Co-orientador: Prof^a. Karla Valéria Batista Lima, Dr.

BELÉM
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) – Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Carvalho, Raimunda Marques de.

Detecção laboratorial de *Chlamydia trachomatis* em escolares da rede pública do Estado do Pará com diagnóstico clínico de tracoma / Raimunda Marques de Carvalho; orientadora, Maísa Silva de Sousa, co-orientadora, Karla Valéria Batista Lima. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. *Chlamydia trachomatis* – Pará. I. Sousa, Maísa Silva de, orient. II. Lima, Karla Valéria Batista. III. Título.

CDD: 22. ed. 16.9235



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

RAIMUNDA MARQUES DE CARVALHO

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis* EM ESCOLARES DA REDE PÚBLICA DO ESTADO DO PARÁ COM DIAGNOSTICO CLÍNICO DE TRACOMA

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais.

Aprovada em:

Conceito:

Banca examinadora:

Prof^a. Máisa Silva de Sousa, Dr.
Orientadora - NMT/UFPA

Prof^a. Karla Valéria Batista Lima, Dr.
Co-orientadora- IEC – UEPA

Prof^a. Edna Aoba Yassui Ishikawa, Dr.
Membro Titular– NMT/UFPA

Prof^a. Luísa Carício Martins, Dr.
Membro Titular – NMT/UFPA

Prof^a. Antônia Benedita Rodrigues Vieira, Dr.
Membro Titular – ICS/UFPA

Prof. José Maria dos Santos Vieira, Dr.
Membro Suplente– ICS/UFPA

Aos meus filhos,
Rayssa, Rafaela e Arthur como
reconhecimento pela imensa
compreensão durante a minha ausência
nestes dois anos de dedicação aos
estudos.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua infinita misericórdia e amor.

Aos meus pais, Ester e Selemérico (*in memoriam*), pelos esforços incansáveis na minha formação Moral e Intelectual

À Dra. Maísa Silva de Sousa pela generosidade e paciência em me orientar e conduzir-me neste árduo caminho da construção do saber científico.

À Dra. Karla Valéria Batista Lima pelo apoio incondicional na realização dos experimentos realizados no Instituto Evandro Chagas.

À Coordenação e professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará – UFPA, pelas valiosas orientações e ensinamentos.

À Secretaria de Estado de Saúde Pública (SESPA) e Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA) pela oportunidade de engrandecimento.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo apoio concedido para a realização dos experimentos.

Aos escolares e familiares que concordaram em participar desta pesquisa permitindo o exame clínico e a coleta de amostra ocular.

Aos mestrandos, companheiros de jornada, pelo apoio e incentivos nas horas difíceis.

Resta essa faculdade incoercível de sonhar
De transfigurar a realidade, dentro dessa incapacidade
De aceita-la tal como ela é, e visão
Ampla dos acontecimentos, e essa impressionante.

E desnecessária presciência, e essa memória anterior
De mundos inexistentes, e esse heroísmo
Estático, e essa pequenina luz indecifrável
A que às vezes os poetas dão o nome de esperança.

Resta esse constante esforço para caminhar dentro do labirinto
Esse eterno levantar-se depois de cada queda
Essa busca de equilíbrio no fio da navalha
Essa terrível coragem diante do grande medo, e esse medo
Infantil de ter pequenas coragens

(Vinícius de Moraes)

Certeza

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de estar sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Fazer da interrupção um caminho novo...

Fazer da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

(Fernando

Sabino)

RESUMO

O tracoma como principal causa de cegueira prevenível no mundo, é uma doença negligenciada relacionada a baixas condições socioeconômicas e locais sem saneamento básico. Presente principalmente nos países subdesenvolvidos traz grandes prejuízos aos cofres públicos com a perda de produtividade e a deficiência visual. Com a criação da Aliança para Eliminação Global de Tracoma em 1997 (GET2020), o Estado do Pará, com apoio do Ministério da Saúde do Brasil, realizaram em 2006 o inquérito epidemiológico do tracoma em escolares de 1ª a 4ª série da rede oficial de ensino, nos municípios com índice de desenvolvimento humano inferior a média nacional, para conhecer a prevalência da doença. Os dados obtidos no inquérito comprovaram que a doença não foi erradicada, revelando 35 municípios paraenses prioritários e prevalências acima de 5%. Uma sub-amostra da conjuntiva de escolares clinicamente positivos foi coletada para a confirmação diagnóstica por Imunofluorescência direta (IFD). O presente estudo utilizou 52 amostras crio conservadas obtidas durante o inquérito, para serem analisadas pelos métodos de IFD e de biologia molecular, na identificação laboratorial da *Chlamydia trachomatis*. Foram encontradas as frequências de 26,92% (14/52) e 49% (24/49) de resultados positivos pelas técnicas de IFD e reação em cadeia da polimerase (*nested-PCR*), respectivamente. Considerando as 49 amostras analisadas pelas duas metodologias, as sensibilidades para a detecção do agente etiológico, por IFD e PCR foram de 28,57% (14/49) e 48,98% (24/49), respectivamente ($p = 0,0127$). As duas técnicas juntas confirmaram a infecção em 57,14% ($n=28$) das amostras, onde 50% ($n=14$) foram positivas apenas pela PCR, 35,72% ($n=10$) para ambas as técnicas e 14,28% ($n=4$) somente pela IFD. A análise de sete sequências nucleotídicas demonstrou homologia para isolados de *C. trachomatis* genótipo L1. Este estudo é pioneiro no Brasil, pois além de confirmar a presença de *C. trachomatis* em amostras oculares de escolares clinicamente positivos para tracoma, validou protocolo de obtenção de DNA a partir de lâminas de IFD crioconservadas, demonstrou a maior sensibilidade do método molecular frente à IFD e identificou o genótipo L1 presente nas amostras.

Palavras chave: *Chlamydia trachomatis*. Tracoma. Inclusão conjuntival. Imunofluorescência direta. PCR.

Abstract

Trachoma as a leading cause of preventable blindness in the world is a neglected disease related to low socioeconomic conditions and locations without basic sanitation. Present mainly in developing countries brings great harm to public coffers in lost productivity and visual impairment. With the creation of the Alliance for the Global Elimination of Trachoma in 1997 (GET2020) the State of Pará, with support from the Ministry of Health of Brazil, held in the 2006 epidemiological survey of trachoma in school 1st to 4th grades of the official network of education in municipalities with the human development index of less than national average, to discover the prevalence of the disease. Data from the survey proved that the disease was not eradicated, revealing 35 priority municipalities in Pará and prevalence above 5%. A sub-sample of the conjunctiva of clinically positive students was collected to confirm the diagnosis by direct immunofluorescence (DIF). The present study used 52 cryopreserved samples obtained during the epidemiological survey to be analyzed by the methods of DIF and molecular biology to laboratorial identification of *Chlamydia trachomatis*. We found frequencies of 26.92% (14/52) and 49% (24/49) of positive results by DIF techniques and polymerase chain reaction (nested-PCR), respectively. Considering the 49 samples analyzed by two methods, the sensitivities for detection of the etiologic agent, by FAT and PCR were 28.57% (14/49) and 48.98% (24/49), respectively ($p = 0,0127$). The two techniques together confirmed 57.14% ($n = 28$) of samples with infection, where 50% ($n = 14$) were positive only by PCR, 35.72% ($n = 10$) for both technical and 14, 28% ($n = 4$) only by the IFD. The nucleotide sequence analysis of seven isolates showed homology to *C. trachomatis* genotype L1. These studies is a pioneer in Brazil, as well as confirm the presence of *C. trachomatis* in samples from ocular school clinically positive for trachoma, validated protocol for obtaining DNA from cryopreserved sheets DIF, showed the highest sensitivity of the molecular method front DIF and identified the genotype L1 in the sample of the conjunctiva of clinically positive students.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*. Trachoma. Conjunctivitis. PCR. Direct immunofluorescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Principais focos do tracoma no Brasil e suas linhas de dispersão.....	21
FIGURA 2	Prevalência do tracoma no Brasil - 1974 a 1976.....	22
FIGURA 3	Mapa da distribuição espacial da prevalência do tracoma por municípios no Pará - 2011.....	24
FIGURA 4	Taxonomia proposta por Everett et al. (1999) para a ordem <i>Chlamydiales</i>	26
FIGURA 5	Topologia circular do genoma da <i>Chlamydia trachomatis</i> A/HAR13...	33
FIGURA 6	Ciclo vital bifásico da <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
FIGURA 7	Biologia intracelular de proteínas da <i>Chlamydia trachomatis</i> associadas a membrana de inclusão.....	42
FIGURA 8	Mapa da distribuição global do tracoma, 2009.....	46
FIGURA 9	Comparação dos limites de detecção do número de Corpo Elementar, em escala logarítmica entre as diferentes técnicas utilizadas.....	54
FIGURA 10	Infecções por <i>Chlamydiaceae</i> em uma região endêmica de tracoma no Nepal, utilizando a genotipagem <i>ompA</i> e gene 16S rRNA.....	57
FIGURA 11	Representação esquemática do protocolo de extração e purificação de DNA a partir de lâminas crio conservadas de IFD.....	64
GRÁFICO 1	Box Plot da média e desvio padrão das idades dos escolares que demonstraram tracoma e cujos materiais da conjuntiva foram coletados para análise da Imunofluorescência direta para pesquisa de <i>Chlamydia trachomatis</i>	72
FIGURA 12	Foto documentação de lâmina de IFD de raspado tarsal superior contendo Corpos Elementares de <i>Chlamydia trachomatis</i>	73
FIGURA 13	Foto documentação de lâmina de IFD de raspado tarsal superior negativa para a presença de Corpos Elementares de <i>Chlamydia trachomatis</i>	74
FIGURA 14	Foto documentação da amplificação do fragmento de 270pb do gene β -globina humana em gel de agarose a 2%.....	75
FIGURA 15	Foto documentação da amplificação do fragmento de 458pb do gene <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> em gel de agarose a 2%.....	76
FIGURA 16	Dendograma das amostras de <i>Chlamydia trachomatis</i> isoladas de raspado ocular e sua relação com cepas de referência.....	82

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Características gerais das <i>Chlamydias</i> com base no genoma.....	25
Tabela 2	Sorotipos da <i>Chlamydia trachomatis</i> e suas associações com doenças humanas.....	29
Tabela 3	Comparação das principais técnicas de detecção da <i>C. trachomatis</i> , utilizando como referência o padrão ouro expandido	52
Tabela 4	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências de <i>Chlamydia trachomatis</i> com as respectivas localizações no gene <i>ompA</i>	66
Tabela 5	Sequências do gene <i>ompA</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> e de <i>Chlamydia pneumoniae</i> depositados no <i>Genbank</i> e utilizadas para comparação com as sequências do estudo.....	69
Tabela 6	Frequência de tracoma em escolares segundo o gênero e a idade.....	73
Tabela 7	Frequência de IFD para <i>Chlamydia trachomatis</i> segundo a celularidade e presença de Corpos Elementares.....	74
Tabela 8	Resultados da PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i> quanto à presença de Corpos Elementares nas amostras.....	77
Tabela 9	Análise comparativa dos métodos de IFD e PCR para <i>C. trachomatis</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ADP	Adenosina Difosfato
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
ATP	Adenosina Trifosfato
CA	Câncer
CDC	<i>Centers for Disease Control</i> – Centro de Controle de Doenças e prevenção
CE	Corpo elementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHSP60	<i>Chlamydial Heat Shock Protein 60</i>
CO	Opacificação Corneana
CPAF	Fator ativo de qualidade da protease
CR	Corpo Reticular
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	Enzimaimunoensaio
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HCl	Ácido Clorídrico
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i> – Proteína de Choque Térmico
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
IDH	índice de desenvolvimento humano
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulinas G
IL – 1 B	Interleucina 1B
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Inc	Proteína da membrana de inclusão
LCR	<i>Ligase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Ligase
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mM	Milimolar
MOMP	<i>Mayor Outer Membrane Protein</i> –Proteína da Membrana Externa

	Principal
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanometro
<i>ompA</i>	Gene que codifica a proteína MOMP
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i> ou Quadro de leitura Aberta
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia de Polimerase
PMN	Polimorfonucleares
PNDST/AIDS	Programa Nacional de Doenças sexualmente transmissível e Aids
PZ	Zona de plasticidade
<i>rDNA</i>	Ácido desoxibonucléico ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossomal
RNA _t	Ácido ribonucléico transportador
RPM	Rotações por minuto
SESPA	Secretaria de Estado de Saúde Pública
SIDA/AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
SUCAM	Superintendência de Campanhas da Saúde Pública
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão de Tris-HCl e EDTA
TF	tracoma folicular
TGF-β1	Fator Beta de Crescimento
Th	Células T <i>helper</i> (auxiliares)
Th1	células linfocitárias Th1
Th2	células linfocitárias Th2
TI	Tracoma inflamatório
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification Assay</i>
TNF - α	Fator de Necrose Tumoral - Alfa
TT	Triquíase Tracomatosa
TTSS	Sistema Secretor Tipo III
VDS	Domínios variáveis
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
h	Hora
Kda	Kilodalton
Kb	Kilobase
mg/m ³	Miligramma por metros cúbicos
min	Minuto
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
pb	Pares de base
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minutos
s	Segundos
TE	Tris + EDTA
UI	Unidades Internacionais
V	Volts
W	Watts
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µg	Micrograma
g	Grama
L	Litro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
4.1	ASPECTO HISTÓRICO.....	20
4.2	AGENTE ETIOLÓGICO.....	24
4.2.1	Taxonomia das Clamídias	24
4.2.2	Morfologia das Clamídias.....	27
4.2.3	Aspecto Genômico.....	32
4.2.4	Ciclo Evolutivo.....	35
4.3	PATOGÊNESE.....	37
4.3.1	Resposta imunológica.....	38
4.3.2	Manifestação clínica.....	43
4.5	EPIDEMIOLOGIA.....	45
4.5.1	Carga global do tracoma e seu custo econômico.....	47
4.5.2	Transmissão.....	49
4.5.3	Fatores de risco.....	49
4.6	DIAGNÓSTICO DO TRACOMA.....	51
4.6.1	Diagnóstico clínico.....	51
4.6.2	Diagnóstico Laboratorial.....	52
4.6.2.1	Diagnóstico diferencial	56
4.7	TRATAMENTO E CONTROLE DO TRACOMA.....	58
5	METODOLOGIA.....	61
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	61
5.2	POPULAÇÃO ALVO DO ESTUDO.....	61
5.3	AMOSTRA DO ESTUDO.....	62
5.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	62
5.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	63
5.6	ETAPAS DO ESTUDO.....	63

5.6.1	Levantamento das amostras	63
5.6.2	Reavaliação das lâminas de IFD.....	63
5.6.3	Protocolo de Extração de DNA bacteriano das amostras crio conservado	64
5.6.4	Protocolo de detecção de DNA da β -globina humano.....	65
5.6.5	Protocolo de detecção de DNA da <i>Chlamydia trachomatis</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	66
5.6.6	Eletrforese.....	67
5.6.7	Purificação de produtos da <i>nested</i> - PCR.....	67
5.6.8	Reação de sequenciamento.....	67
5.6.8.1	Precipitação do produto da reação de sequenciamento.....	68
5.6.8.2	Eletrforese capilar do DNA sequenciado.....	68
5.6.8.3	Análise das sequências	69
5.7	NORMAS ÉTICA.....	70
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
6	RESULTADOS	72
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO ESTUDO.....	72
6.2	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	73
6.3	PCR PARA GLOBINA HUMANA.....	75
6.4	<i>NESTED</i> - PCR PARA <i>Chlamydia trachomatis</i>	76
6.5	ANÁLISE COMPARATIVA DOS DOIS MÉTODOS NA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Chlamydia trachomatis</i>	77
6.6	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE <i>ompA</i> DA <i>Chlamydia trachomatis</i>	78
7	DISCUSSÃO	80
8	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	97
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

O tracoma é a doença ocular mais frequente e a causa mais comum de cegueira evitável no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003) estima que haja aproximadamente, 84 milhões de pessoas afetadas pelo tracoma em 57 países endêmicos, o que corresponde a 10% da população mundial com tracoma ativo precisando ser tratada, além de 8,2 milhões de pessoas com triquíase e mais de 7 milhões de pessoas irreversivelmente cegas devido a opacificação corneana causada por complicações do tracoma (ABBAS et al., 2009; BURTON; MABEY, 2009; MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2009; ZHANG et al., 2010).

A *Chlamydia trachomatis* (CT), agente etiológico do tracoma, sorotipos A, B, Ba e C, causam uma afecção inflamatória ocular crônica, recidivante, com produção de secreção purulenta que facilita a reinfecção pelo agente etiológico e garante a cronicidade da inflamação com resposta exacerbada do sistema imune. Fenômenos fisiopatológicos como a formação de Entrópio e Triquíase na pálpebra superior fazem com que os cílios invertidos toquem no globo ocular causando dor constante e intensa fotofobia, podendo levar a graus variados de diminuição da acuidade visual até a cegueira (ANDREASEN et al., 2008; BRASIL, 2001; CHINEN et al., 2006; HU et al., 2010).

O homem com infecção ativa na conjuntiva ou em outras mucosas é a única fonte de infecção e, os principais reservatórios das formas ativas são as crianças em idade pré-escolar (BRASIL, 2004; CHINEN et al., 2006; KOIZUMI et al., 2005; OMS, 2006).

A transmissão se dá pelo contato direto (olho a olho ou mãos contaminadas com secreção ocular) e contato indireto (por vestuário e objetos contaminados ou por vetores mecânicos como a proliferação de moscas domésticas) (BRASIL, 2001, 2004; CHINEN et al., 2006; SCHELLINI et al., 2010; OMS, 2001).

Relacionado a baixas condições socioeconômicas e a locais sem saneamento básico, o tracoma restringe-se quase que exclusivamente às populações de baixo poder socioeconômico de países subdesenvolvidos (ABBAS et al., 2009; DAMASCENO et al., 2009; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004), sendo muito

prevalente no mundo todo, sobretudo na Índia, África subsaariana, Ásia e América do Sul (HU et al., 2010; KOIZUMI et al., 2005; OMS, 2006).

No Brasil, o tracoma é endêmico em várias regiões apesar de já ter sido considerado erradicado na década de 1970, quando a realização de campanhas pelo Ministério da Saúde impactou profundamente na incidência e na prevalência da doença no país (BRASIL, 2001).

No inquérito epidemiológico de âmbito nacional realizado nos anos de 1974 a 1976, as unidades federativas que apresentaram maior prevalência da doença foram: o Pará (26,2%), o Amazonas (15,7%) e Roraima (14,6%) (CHINEN et al., 2006). Desde então, a ausência de ações de vigilância e controle do tracoma contribuíram para o desconhecimento sobre a prevalência e morbidade do mesmo no Brasil e em especial, no Pará (BRASIL, 2008), motivando o Ministério da Saúde a realizar novo inquérito epidemiológico de tracoma em nível nacional, nos anos de 2002 a 2007.

No Pará, no período de maio a setembro de 2006, a Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará realizou o inquérito epidemiológico do tracoma por amostragem, em escolares de 1ª a 4ª série do ensino fundamental da rede pública, residentes em municípios com índice de desenvolvimento humano menor que a média nacional (IDH < 0.764 - IBGE 2000), esclarecendo sobre a prevalência do tracoma no Estado e demonstrando que a doença não estava erradicada como se acreditava. O diagnóstico clínico foi realizado por examinadores padronizados pelo Ministério da Saúde, adotando a classificação feita por Thylefors et al. (1987) (ANEXO A).

Para confirmação da circulação do agente etiológico na comunidade estudada, realizou-se diagnóstico laboratorial em amostras do raspado da conjuntiva dos escolares com diagnóstico clínico de tracoma folicular e / ou inflamatório, pela técnica da imunofluorescência direta (IFD) que por ser uma técnica simples, está disponível nos laboratórios da rede pública e apresentar alta especificidade. No entanto, sua sensibilidade é baixa para o tracoma sendo mais adequada para o estabelecimento de focos endêmicos e não para a confirmação individual de cada caso (MEDINA et al., 1996).

2 JUSTIFICATIVA

O tracoma é a principal causa de cegueira prevenível no mundo. Embora o diagnóstico clínico do tracoma seja soberano, o diagnóstico laboratorial é fundamental para a confirmação do agente etiológico.

Com o objetivo de conhecer a prevalência do tracoma em escolares nas zonas rural e urbana dos municípios paraenses e dar subsídios à planificação e implantação de programas de controle da doença, a Secretaria de Estado de Saúde Pública, com apoio do Ministério da Saúde, realizou no ano de 2006, o inquérito epidemiológico do tracoma no Pará, quando através do exame ocular do tarso superior de escolares da rede pública foi dado o diagnóstico clínico.

Em vista da técnica de imunofluorescência direta (IFD), utilizada como método de escolha para o diagnóstico laboratorial do tracoma, não possuir sensibilidade suficiente para confirmação de todos os casos clinicamente positivos, torna-se necessário utilizar técnicas mais sensíveis, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), capaz de detectar a presença da bactéria nas amostras coletadas objetivando a comprovação da circulação do agente etiológico do tracoma (*Chlamydia trachomatis*) em localidades onde a IFD não foi capaz de identificar a presença do agente.

Será utilizado os métodos de IFD e PCR, quando se avaliará a sensibilidade da IFD e do método molecular proposto

Este enfoque é pioneiro no Brasil, pois propõe uma metodologia molecular para, ao mesmo tempo, confirmar a infecção e identificar os sorotipos presentes nos casos com sinais clínicos de tracoma, o que confere ao presente estudo um caráter relevante à saúde pública, uma vez que pode demonstrar a real frequência da *Chlamydia trachomatis*, associada aos casos de tracoma no Estado do Pará, além da viabilização de uma metodologia mais sensível para o programa de controle do tracoma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar identificação laboratorial de *Chlamydia trachomatis* em escolares da rede pública do Estado do Pará com diagnóstico clínico de tracoma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comprovar a circulação da *Chlamydia trachomatis* em amostras de escolares com sinais clínicos de tracoma por IFD e PCR.

Demonstrar a frequência da *Chlamydia trachomatis* em amostras de escolares com sinais clínicos de tracoma.

Comprovar a sensibilidade da IFD na identificação laboratorial da *Chlamydia trachomatis* em amostras de escolares com sinais clínicos de tracoma.

Identificar os genótipos de *Chlamydia trachomatis* em amostras de escolares com sinais clínicos de tracoma.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 ASPECTOS HISTÓRICO

O tracoma, doença de maior distribuição mundial e milenarmente conhecida, teve o seu primeiro relato em 1556 a.C. no Egito, com a descoberta de papiro contendo descrições de uma doença com característica de tracoma, por George Ehers (PELICIONO et al.,1992).

No século 27 a.C. já se conhecia o tracoma e a triquíase, o que confirma a hipótese do surgimento da doença nos primórdios dos povos nômades da Mongólia e, sua disseminação através de invasões para a China, Sibéria e costa do Mediterrâneo. Outros relatos da doença surgiram no Egito em 525 a.C. (BRASIL, 2001; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; PELICIONO et al., 1992).

Segundo AMAT (1923 apud PELICIONO et al., 1992 p.178), em 48 a.C., em Roma, Cícero afirmava que médicos oculistas operavam catarata e tratavam triquíase.

Para TANG et al.(1957 apud DAROUGAR e JONES, 1983 p. 117) relataram que a *Chlamydia* só veio a ser associada com o tracoma, após a identificação de inclusões intracitoplasmática em raspado conjuntival de orangotangos infectados durante um experimento, com material de conjuntiva tracomatosa. Sendo o seu agente etiológico isolado com sucesso na década de 30.

Com as guerras e as grandes migrações ocorridas na idade média o tracoma disseminou-se através da Grécia e do mundo islâmico para o restante da Europa (BRASIL, 2001). Na Europa e América do Norte, o tracoma foi a principal causa de cegueira no século XIX (LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004). Segundo Maccallan; Hirschberg (1982; 1931, apud HU et al., 2010, p. 673), a morbidade da doença na Europa levou as autoridades sanitárias da época a fundarem importantes hospitais oftalmológicos para tratamento dos enfermos.

O tracoma foi Introduzido no Brasil no século XVIII, por ciganos expulsos de Portugal, que se instalaram nas províncias do Maranhão e Ceará (Fig. 1) formando os primeiros bolsões da doença no país. A disseminação no nordeste se deu por

conta da migração de operários de lavouras e das peregrinações religiosas que atraíam milhares de romeiros para localidades com precárias condições sanitárias e escassez de água (FREITAS, 1967, 1977).

FIGURA 1 – Principais focos do tracoma no Brasil e suas linhas de dispersão.



Fonte: Adaptado de MS /SUCAM Manual de Controle do Tracoma, 2001.

Com a imigração Europeia no século XIX, para os Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, novos focos de tracoma (Fig. 1), surgiram no Brasil.

Imigrantes tracomatosos procedentes de países do Mediterrâneo entravam livremente no país, sem nenhuma vigilância sanitária (PELICIONO et al., 1992). O tracoma disseminou-se então para outras regiões por migrações internas, em direção ao sudeste até os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Na Amazônia, a doença foi introduzida durante o ciclo da borracha, (DAMASCENO et al., 2009; FREITAS, 1967, 1977; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004).

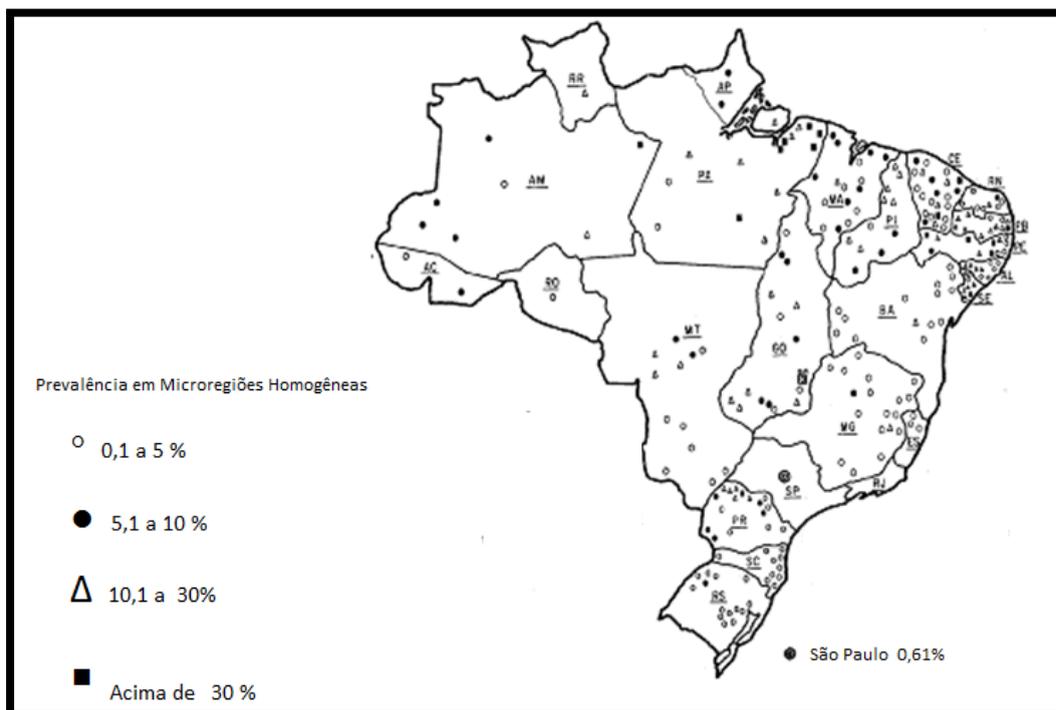
A partir de 1943, com a campanha nacional para o combate ao tracoma, o governo federal formou médicos tracomatologistas e instalou postos de tratamento de tracoma em áreas endêmicas que, associado ao ciclo de desenvolvimento

econômico no início da década de 1950, impactou profundamente na ocorrência da doença com intensa diminuição nas taxas de detecção, a ponto de ser considerada erradicada (BRASIL, 2001; DAMASCENO et al., 2009; FREITAS, 1966, 1976, 1977).

Após o combate da endemia tracomatosa em nível nacional, a estrutura da campanha federal do tracoma foi desmontada e as ações deixaram de ser executadas (FREITAS, 1966, 1976).

No inquérito do tracoma ocorrido nos anos de 1974 a 1976 (Fig. 2), o maior número de casos detectados na região Norte, foi nos Estados do Pará e de Roraima. Após esta década, o Ministério da Saúde considerou a doença sub endêmica e, ações de vigilância e controle do tracoma deixaram de ser executadas (FREITAS, 1976, 1977).

FIGURA 2- Prevalência do Tracoma no Brasil - 1974 a 1976.



Fonte: Adaptado de MS/SUCAM, Freitas, 1976.

No Pará, os últimos dados oficiais do tracoma são da década de 1980, quando a Divisão de Endemias Focais (DIENF) da Diretoria Regional do Pará da Superintendência de Campanhas da Saúde Pública (SUCAM), realizou inquéritos

em escolares obtendo taxas de prevalência que variaram de 11,8% a 52,1% nos municípios de Igarapé Açu, Ourém, São Francisco do Pará, Santa Isabel do Pará, Benevides e Santo Antônio do Tauá (SUCAM, 1989).

Em 1990, as atividades de controle do tracoma tornaram-se atribuições da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA (BRASIL, 2001). O processo de descentralização das ações de saúde foi efetivado, e as endemias, que antes eram coordenadas pela esfera federal, passaram para o Estado, e gradativamente as atividades de controle do tracoma deixaram de ser executadas.

O mito do crescimento econômico iniciado nos anos de 1950 impactou profundamente na prevalência do tracoma, a ponto de ser declarado erradicado em muitos Estados (BRASIL, 2001), trazendo graves prejuízos à Saúde Pública Brasileira principalmente, pela ausência de capacitação para médicos generalistas e oftalmologistas realizarem diagnóstico clínico e tratamento do tracoma (BRASIL, 2001).

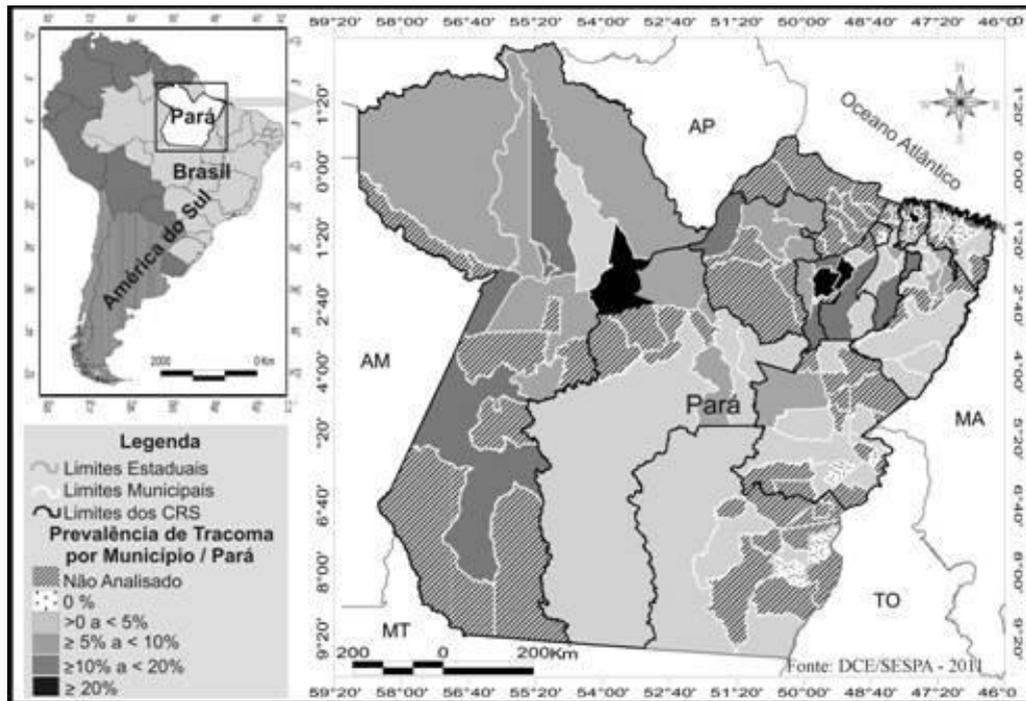
Com o descobrimento de novos casos de tracoma inflamatório em pré-escolares, no município de Bebedouro, região nordeste de São Paulo (LUNA et al., 1992), a discussão do tracoma como problema de saúde pública foi retomada e, outros estudos de prevalência da doença, realizados em vários estados brasileiros como: São Paulo, Bahia, Ceará, Pernambuco, Amazonas, Santa Catarina e Paraná (LUNA et al., 1992; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; MACHADO et al., 2009) comprovaram a circulação do agente etiológico e a existência do tracoma com característica endêmica no país.

Os dados de prevalência obtidos nesses estudos levaram o Ministério da Saúde à realização do último inquérito nacional do tracoma, ocorrido entre 2002 a 2007, com o objetivo de conhecer a situação epidemiológica desse agravo no Brasil.

O Pará concluiu o inquérito com o alcance de 95,94% (6.908) da amostra determinada de escolares (Fig. 3), além de 1.682 comunicantes, onde foram encontrados 479 (6,93%) escolares e 233 (13,85%) comunicantes com sinais clínicos do tracoma. Em quatro dos 73 municípios participantes (Fig. 3), não foram identificados casos de tracoma. No restante foram identificadas as prevalências de

>0 a <5%, ≥ 5 a <10%, ≥ 10 a <20% e $\geq 20\%$ em 34, 18, 13 e 4 municípios, respectivamente. Os municípios com as maiores prevalências foram Marapanim (29,37%), Prainha (22,22%), Igarapé Mirim (22,09%) e Cametá (20,39%)(dados não publicados).

FIGURA 3 – Mapa da distribuição espacial da prevalência do tracoma por municípios no Pará -2011.



Fonte: DCE/SESPA (dados não publicados).

4.2 AGENTE ETIOLÓGICO

4.2.1 Taxonomia das Clamídias

As Clamídias foram historicamente classificadas (Fig. 4) na ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, na qual está inserido um único gênero *Chlamydia* com quatro espécies: *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae* patógenos exclusivamente de humanos; *Chlamydia psittaci*, patógeno de aves e de alguns mamíferos inferiores e a *Chlamydia pecorum*, responsável por infecção em bovinos, ovinos e suínos (MOULDER, 1984; STORZ; PAGE, 1971).

A classificação atual baseia-se em critérios morfológicos, genéticos e critérios fenótipos limitados, não considerando outros microrganismos intracelulares com o

mesmo ciclo de desenvolvimento das *Clamídias* (EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999).

Um marco na taxonomia das Clamídias, que rompeu o paradigma de agrupamento por sorologia e afinidade, foi a identificação de cepas de *Chlamydia trachomatis* por seus acúmulos de glicogênio nas inclusões e sua sensibilidade à Sulfadiazina, ao contrário da *Chlamydia psittaci* que não acumula glicogênio e são, geralmente, resistentes à Sulfadiazina (EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999).

A partir da década de 1980, o desenvolvimento de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, forneceram novas metodologias para diferenciação e classificação de grupos de Clamídias (Tab. 1), como a reassociação DNA-DNA, estabelecida como uma ferramenta para distinguir espécies, análise filogenética dos genes rRNA, antígenos de superfície e proteínas de plasmídeo, genes da MOMP (proteína da membrana externa principal) que estão sendo utilizados na reconstrução da Árvore evolutiva da *Chlamydiaceae* (HORN et al., 2004, EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999; BUSH; EVERETT, 2001; COLLINGRO et al., 2011).

Tabela 1 - Características gerais das *Clamídias* com base no genoma.

	<i>Chlamydia</i> ambiental	<i>Chlamydophila</i> <i>caviae</i> GPIC	<i>Chlamydophila</i> <i>pneumoniae</i> CWLO29	<i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> sv D	<i>Chlamydia</i> <i>muridarum</i> MoPn
Cromossomo (pb)	2.414,465*	1.173,390	1.230,230	1.230,230	1.072,950
Plasmídeo (pb)	-	7.966	-	7.493	7.501
Conteúdo G+C (%)	35.8	39.2	40.6	41.3	40.3
Total de CDSs	2.031	1.009	1.073	894	921
Com atribuição funcional	784 (38%)	605(60%)	636(59%)	604(67%)	583(61%)
Conservação hipotética No segmento homólogo desconhecido	623 (31%)	320(32%)	251(23%)	35(4%)	281(31%)
Densidade codificação(%)	83	88	88	90	90
Comprimento médio do gene(pb)	962	1.03	1.031	1.049	1.064
Operons rRNA	3	1	1	2	2
tRNAs	35	38	38	37	37

Fonte : Adaptado de Horn et.al., 2004.

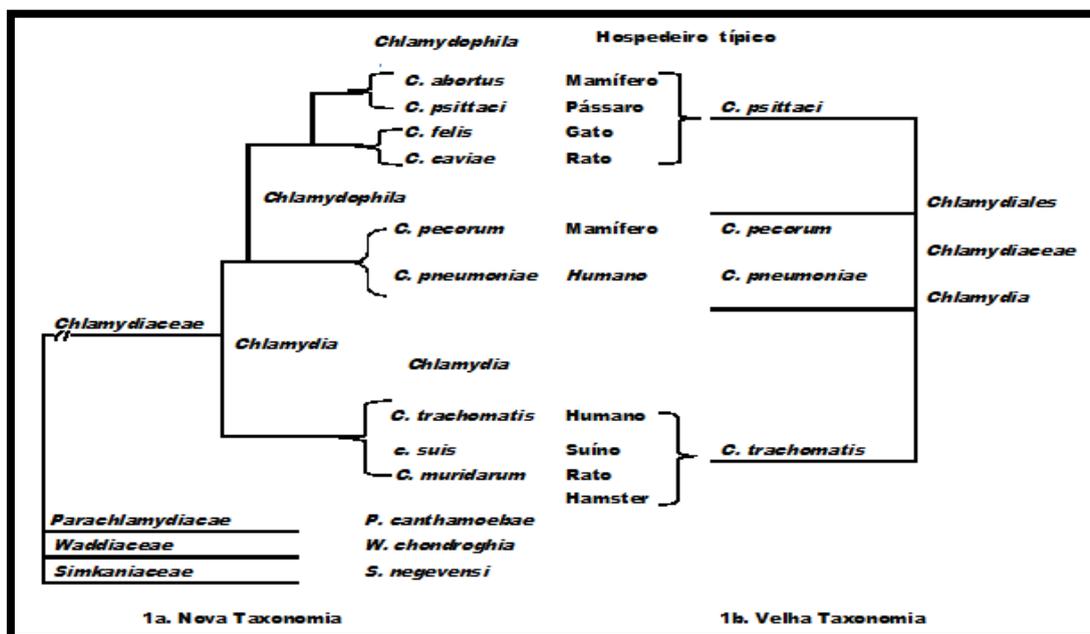
*Sequência contendo uma diferença de cerca de 3 kb, Cepas: GPIC, CWLO29, svD, MoPn.

A descoberta de novos organismos na ordem *Chlamydiales* isolados de anfíbios, mamíferos e fontes ambientais como a *Parachlamydia acanthamoebae*,

parasitas de amebas que podem estar associadas com doença em seres humanos, tem comprovado a diversidade de hospedeiros das *Clamídias* e contribuído para uma nova percepção de distribuição das mesmas (EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999; HORN et al., 2004; DEAN et al., 2008).

Everett, Bush e Andersen (1999), utilizando ferramentas de amplificação de ácidos nucleicos em análise filogenética dos genes 16S rRNA e 23S rRNA na ordem *Chlamydiales*, observaram que as sequências dos genes 16S rRNA apresentavam uma similaridade superior a 90% encontrando uma concordância de 100% com rDNA utilizando o gene 23S rRNA. Os resultados obtidos no estudo levaram os autores a proporem (Fig. 4) a esta ordem, quatro famílias distintas e dois gêneros com nove espécies para a família *Chlamydiaceae* (EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999; SCHACHTER et al., 2001).

FIGURA 4 - Taxonomia proposta por Everett et al. (1999) para a ordem *Chlamydiales*.



Fonte: Adaptado de Bush e Everett, 2001.

Esta recomendação ainda não obteve aprovação no meio científico pela grande controvérsia que causou.

4.2.2 Morfologia das Clamídias

Os membros da família *Chlamydiaceae* são procariotos intracelulares obrigatórios, capazes de infectar uma extensa variedade de espécies causando vários problemas de saúde nos homens e em animais, com muitas características comuns.

Todas as espécies do gênero *Chlamydia* são patogênicas e apresentam o mesmo ciclo de desenvolvimento bifásico com duas formas morfofisiológicas distintas e compartilhamento de sequências genômicas (LI et al., 2008; SAKA et al., 2011).

As Clamídias apresentam duas formas distintas: O Corpo Elementar (CE) é uma estrutura pequena, cocoide de 300 nm, com citoplasma granular, presença de ribossomo 70S e DNA concentrado em um cromossomo excêntrico circundado por uma rígida parede trilaminar (BELLAND et al., 2003; MOULDER, 1991), e o Corpo Reticular (CR) que são estruturas maiores chegando a 1.000 nm de diâmetro que possuem um DNA fibrilar difuso e alta concentração de ribossomos, formam inclusões citoplasmáticas ricas em glicogênio (MOUDER, 1982).

As Clamídias são bactérias gram negativas com parede celular rígida, trilaminar desprovida da camada de peptidoglicano, termolábel, imóvel, de forma cocoide com aproximadamente 0,3 a 1,0 μm . Possuem uma molécula de DNA e RNA e ribossomo que evidenciam uma reduzida atividade metabólica de síntese proteica, mas não sintetizam ATP, realizam o transporte de energia através da importação de ATP do citosol da célula do hospedeiro com adenosina difosfato (ADP), com um ATP/ADP translocase (BELLAND et al., 2003; HORN et al., 2004 ; MOULDER, 1982).

A parede celular é composta por 1/3 de proteína e 2/3 de lipídios, desprovida da camada de peptidoglicano, Ácido Murâmico e proteínas ligáveis à Penicilina; é constituída por dois antígenos: a proteína Lipopolissacarídeo (LPS) constituída por Ácido Cetodeoxietanóico e o antígeno MOMP que representa 60% do peso da membrana (KARI et al., 2009; POIARE et al., 2008; SEADI et al., 2002).

A MOMP tem sido utilizada na caracterização sorológica dos sorovares da *Chlamydia trachomatis* por serem espécie e subespécie-específico, além de candidata alvo no desenvolvimento de vacinas para o tracoma (KARI et al., 2009; ANDREASEN et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2008). Além disso, representa proteína essencial da parede celular da *C. trachomatis* é codificada pelo gene *omp1* que contém quatro domínios variáveis (VDS), chamados de VD1 a VD4 que se encontram intercalados com cinco regiões de sequências altamente conservadas (LIMA et al., 2007; RUETTGER et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2008).

A classificação dos sorovares é feita pela identificação de três das quatro regiões das sequências variáveis da proteína MOMP, denominada VD1, VD2 e VD4 que são expostas na superfície da membrana (LIMA et al., 2007; RUETTGER et al., 2011; SRIVASTAVA et al., 2008).

A *C. trachomatis* é classificada sorologicamente em 19 sorotipos com base na proteína da membrana externa principal (MOMP) (ANDREASEN et al., 2008; LIMA et al., 2007; KINT et al., 2010; SOMBOONNA et al., 2008; THOMPSON et al., 2008). Divididos em dois biovars, tracoma e linfogranuloma venéreo, que podem ser classificados de acordo com as diferentes apresentações clínicas (Tab. 2). Os sorotipos A, B, Ba e C estão associados ao tracoma endêmico; L1, L2, L2A, L2B e L3 ao Linfogranuloma venéreo e, os sorotipos D, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K associados a infecções genitais e em neonatos (KINT et al., 2010; SOMBOONNA et al., 2008).

Associada a diferentes infecções humanas (Tab. 2), pode comprometer os olhos (tracoma e conjuntivite de inclusão do recém-nascido), o trato respiratório (pneumonite) e o trato urogenital (linfogranuloma venéreo, uretrite não gonocócica, cervicite, endometrite, salpingite e doença inflamatória pélvica - DIP, que como consequência, pode levar a infertilidade e a gravidez ectópica) (BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; FERNANDES et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009; LIMA et al., 2007; MARQUES; MENEZES, 2005; MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003).

Tabela 2 - Sorotipos da *Chlamydia trachomatis* e suas associações com doenças humanas.

Sorotipos	Doenças humanas	Formas de disseminação	Patologia
A, B, Ba e C	Tracoma ocular, Tracoma endêmico	Mãos aos olhos, fomites, moscas.	Conjuntivite
D, E, F, G H, I, Ia, J Ja e K	Doença óculo genital, Uretrite, Oftalmia, Cervicite, Bartholinite, Pneumonia, Endometrite, Síndrome de Reiter, Salpingite (DIP), Peri-hepatite, Câncer de colo uterino.	Sexual e Perinatal	Uretrites, Cervicites, Endometrites, Doença Inflamatória Pélvica (DIP), Infertilidade, Gravidez Ectópica, Conjuntivite Neonatal e Pneumonia Infantil.
L1, L2, L2A L2B e L3	Linfogranuloma venéreo	Sexual	Invasão da Submucosa Linfo- nodular com granulomas necrosantes e Fibrose.

Fonte: Adaptado de Miranda; Gadelha; Passos, 2003.

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) estão entre as infecções mais prevalentes no mundo. Dentre elas, as infecções por *Chlamydia trachomatis* (CT) são as de maior incidência, com mais casos novos do que qualquer outra DST conhecida (MARQUES et al., 2007).

Estudos da Organização Mundial da Saúde (2005) e do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, 2002) inferem que ocorrem em torno de 92 milhões de novos casos de *Chlamydia* a cada ano, a maioria nos países em desenvolvimento, sendo metade na população compreendida na faixa etária de 15 a 24 anos de idade (JALIL et al., 2008).

No Brasil, o Ministério da Saúde estima que a cada ano, ocorram 1.967.200 casos novos (PNDST/AIDS, 2006). Infecções por *Chlamydia* apresentam elevado índice de complicação para a saúde reprodutiva por acometerem, de forma particular, mulheres jovens (BENZAQUEN et al., 2010; JALIL et al., 2008).

A infecção sexual inicia-se usualmente pela endocérvice, podendo ocorrer na uretra e no reto, as clamídias replicam-se dentro de vacúolos da célula epitelial

hospedeira, originando inclusões citoplasmáticas características. O ciclo de desenvolvimento e a predileção para causar infecções persistentes são características distintivas deste patógeno (MOULDER, 1991).

O maior impacto da infecção por *Chlamydia* ocorre no sistema reprodutivo das mulheres. A recorrência das infecções é comum especialmente nos indivíduos que se infectam antes dos 20 anos (GIRALDO; SIMÕES, 2000; MARQUES; MENESES, 2005; OLIVEIRA et al., 2008; SEADI et al., 2002) sendo a precocidade do início da vida sexual, o mais importante fator de risco.

Infecções geniturinárias por *C. trachomatis* em mulheres inicia com um quadro de cervicite. Graves consequências advêm do fato da infecção apresentar alta incidência em assintomáticos (SACHDEVA et al., 2009). Mais de 70% das mulheres com lesão tubária apresentam anticorpos circulantes para *C. trachomatis* (BENZAQUEN et al., 2010; GIRALDO; SIMÕES, 2000; JALIL et al., 2008; MARQUES; MENESES, 2005; SACHDEVA et al., 2009).

Para Fernandes et al. (2004) a ascensão deste patógeno, da cérvix ao aparelho reprodutivo alto, causa complicações como salpingite, abscessos ovarianos e a doença inflamatória pélvica aguda (DIP), maior fator de risco das DST e a seqüela mais temida por afetar diretamente a vida reprodutiva da mulher, culminando em esterilidade definitiva.

Em portadoras sintomáticas, produz secreção muco purulenta pelo orifício externo do colo uterino, juntamente com processo inflamatório local, podendo ser acompanhado por dor pélvica crônica ou dispareunia, e sangramento no ato sexual (MARQUES; MENESES, 2005; SEADI et al., 2002).

Hoje, o diagnóstico precoce da *C. trachomatis* antes que ocorra a doença infecciosa pélvica é uma preocupação mundial. A DIP representa um grave problema que acarreta altos custos aos serviços de saúde e aos cofres públicos (FERNANDES et al., 2004; GONÇALVES et al., 2009; MARQUES; MENESES, 2005; SEADI et al., 2002). Com mais de um milhão de episódios a cada ano, mulheres jovens com menos de 19 anos de idade apresentam maior risco para desenvolverem DIP.

Evidências científicas correlacionam a infecção por *C. trachomatis* e lesões intra-epiteliais cervicais com o desenvolvimento de neoplasia cervical e aumento na incidência de câncer de colo de útero (GONÇALVES et al., 2009; BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; OLIVEIRA et al., 2008).

As Infecções por *Chlamydia* em gestantes estão associadas a complicações graves, como parto prematuro, endometrite pós-parto, amniorrexe prematura, baixo peso ao nascer e óbito neonatal. Mulheres que tiveram DIP apresentam risco 10 vezes maior de desenvolver gravidez ectópica. Destas, 15% evoluem a óbito (FERNANDES et al., 2004; BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; MARQUES; MENESES, 2005).

A DIP, quando não tratada pode provocar infecções congênitas, perinatal, e morte materna durante o primeiro trimestre da gestação (BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009).

Aproximadamente dois terços dos recém-nascidos de mães infectadas apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de conjuntivite neonatal, pneumonia intersticial atípica, bronquite e otite média (JALIL et al., 2008; POIARES et al., 2007; SEADI et al., 2002).

Marques e Meneses (2005, p. 68) afirmam que “[...] 30% a 50% das crianças nascidas de mães infectadas pela CT terão conjuntivite e quase 50% delas terão, também, infecção nasofaríngea, das quais 30% desenvolverão pneumonia por clamídia”.

No neonato a *C. trachomatis* é a causa mais comum de conjuntivite de inclusão. Se não tratada, por volta de duas semanas, pode evoluir e causar pneumonia. O tratamento da pneumonia eventualmente provoca extenso período de internação, ocasionando como seqüela, deficiência pulmonar. A profilaxia é ineficaz em 15% a 25% dos casos de conjuntivites em recém-nascidos expostos à *C. trachomatis* (GIRALDO; SIMÕES, 2000; SEADI et al., 2002).

Pelo aumento da incidência de partos prematuro, infecções por *C. trachomatis* apresentam elevado risco de morbidade e mortalidade neonatal. A

evolução é insidiosa, oligossintomática ou assintomática (FERNANDES et al., 2004), na maior parte das vezes não perceptível ao clínico. Quando sugestivo, a pouca oferta de diagnóstico na rede assistencial do Sistema Único de Saúde(SUS) dificulta o acesso ao tratamento, por conseguinte, muitas mulheres não são tratadas.

Nos homens, infecções urogenitais por *C. trachomatis* causam artrite e epididimite podendo levar a obstrução uretral e até infertilidade (BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; SACHDEVA et al., 2009).

Os sorotipos L1, L2 e L3 causam uma rara doença infectocontagiosa sexualmente transmissível de caráter inflamatória, invasiva e sistêmica, conhecida como linfogranuloma venéreo (LGV) (SETH-SMITH et al., 2009), importante causa de doença ano genital principalmente entre homens que praticam sexo com outros homens (BELDA JÚNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009).

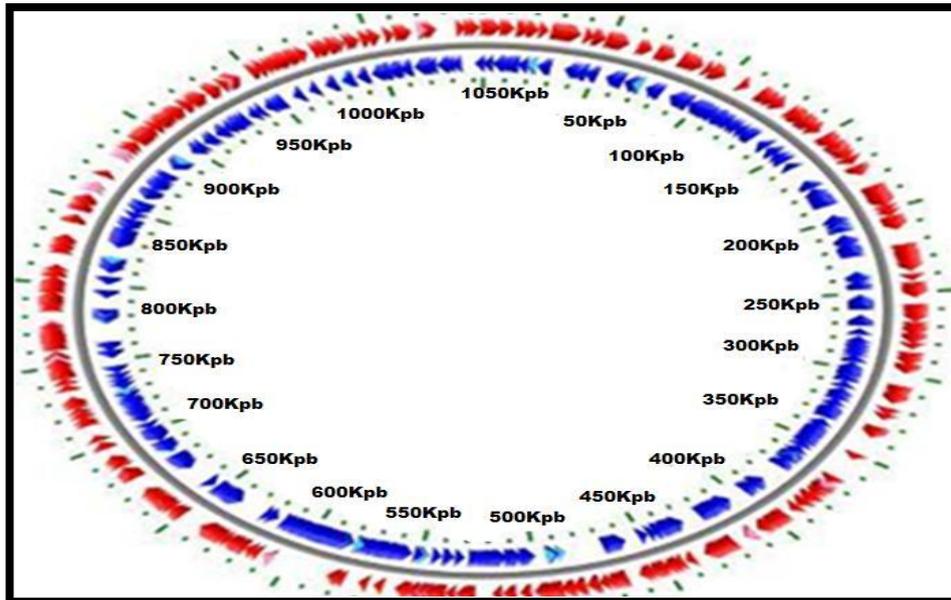
A linfadenopatia inguinal é a manifestação clínica mais comum, que aparece semanas após a lesão primária comumente localizada no prepúcio ou glândula nos homens e na vulva ou parede vaginal nas mulheres. As principais queixas são gânglios dolorosos e unilaterais com ou sem abscessos (bubões). Proctites hemorrágicas ocorrem por inoculação direta e são mais comuns em homens que mantêm relações sexuais com homens (HALSE et al., 2006; HERNANI; NADAL, 2007).

4.2.3 Aspecto Genômico

A *C. trachomatis* tem um genoma completo constituído por um cromossomo único circular de 1.042.519 pb (Fig. 5), com 58.7% de seu peso de A-T.

As espécies do gênero *Chlamydia* apresentam um dos menores genomas conhecido entre os organismos vivos. Codificam aproximadamente 875 proteínas. Destas, 70 são exclusivas da espécie *Chlamydia trachomatis*. Contém RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S (CARLSON et al., 2008; CLARKE, 2011; SETH-SMITH et al., 2009).

FIGURA 5 - Topologia circular do genoma da *Chlamydia trachomatis* A/ HAR13.



Fonte: Adaptado de http://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c1/C_trachomatisGenome.jpg
gene 953 1.044.459 pb acesso: NC .007429.

Os genomas menores (1,04 -1,3 Mb) apresentam alto grau de conservação, com exceção da região polimórfica do genoma denominada zona de plasticidade (PZ). Na zona de plasticidade ocorre grande variação significativa de genes entre cepas de *C. trachomatis* que pode ser um fator de virulência. O operon *trpBA* que reside no PZ é exclusivo de isolados humanos e confirma a hipótese da viremia ao distinguir cepas oculares de isolados genitais com base na quantidade significativa de variação no PZ (CARLSON et al., 2008; SETH-SMITH et al., 2009).

Estudos realizados com isolados genitais mostraram um operon intacto codificando uma sintaxe de triptofano funcional, enquanto cepas oculares apresentaram mutações nos genes *trpA* ou *trpB* que resultaram em uma sintaxe não funcional. A capacidade de sintetizar triptofanos funcionais foi um fator de virulência potencial para cepas genitais, mas não para cepas oculares (CARLSON et al., 2008; SETH-SMITH et al., 2009).

Cada célula bacteriana possui de 7 a 10 cópias de DNA plasmidial e uma cópia do DNA do genoma da proteína da membrana externa principal (MOMP) da *C. trachomatis*. O plasmídeo codifica oito genes todos transcritos e traduzidos durante o ciclo de desenvolvimento (WANG et al., 2011).

O Plasmídeo críptico de 7,5 kb PCTA, pCTT1, pCHL1, pLVG440 e pLGV2 identificados e sequenciados da *C. trachomatis* sorotipos A, B, D, L1, e L2, são altamente conservados e transportam oito quadros de leitura aberta (ORFs), designado pORF-1 a pORF-8 (BELLAND et al., 2003; LI et al., 2008) também denominados de Sequências Codificadoras previstas (CDSs) formados por um conjunto de quatro repetições de 22 pb (COLLINGRO et al., 2010; HORN et al., 2004; SETH-SMITH et al., 2009).

Embora a função biológica do plasmídeo no desenvolvimento da *Chlamydia* ainda permaneça desconhecida, tem sido relacionado à síntese de glicogênio e considerado um fator de virulência (CLARKE, 2011). O plasmídeo é relativamente estável e mais resistente a danos de nucleases do que o genoma, estando presente em até dez cópias por genoma, tem sido visto como um possível fator confiável para testes de diagnóstico (SETH-SMITH et al., 2009).

O pORF imediatamente jusante da origem de replicação do plasmídeo foi designado pORF1, pCT7 ou ppg7. O pORF1 e pORF2 codificam proteínas provavelmente envolvidas na replicação do plasmídeo. O homólogo do helicase pORF3 está envolvido no desenrolamento do DNA de dupla fita durante a replicação. O pORF4 não tem função conhecida. O pORF5, também designado ppg3, codifica uma proteína de 28 kDa cuja função não muito clara, parece ser reconhecida por anticorpos humanos e de animais infectados por *Chlamydia* para induzir imunidade protetora. O pORF6 codifica uma proteína de 101-102 aminoácidos com função desconhecida, e o pORF7 e o pORF 8 codificam proteínas que podem estar envolvidas na regulação da separação e no número de cópias geradas. Todas as proteínas que são secretadas por *Chlamydia*, nas membranas de inclusão ou no citosol da célula hospedeira, podem participar na imunopatogenicidade (LI et al., 2008).

HC1 e HC2 são proteínas de ligação do DNA à histona H1, codificadas pelos genes *hctA* e *hctB* e, expressas no final do ciclo de vida quando os CR são convertidos em CE, com compactação da cromatina. A HC1 possui dois domínios: N-terminal conservado relacionado com a dimerização e o domínio C-terminal responsável por DNA vinculativo, rico em lisina. A HC2 apresenta oscilações em seu

tamanho entre os diferentes sorovares em função de variações no número das repetições pentâmeras ricas em lisina. Estas proteínas são capazes de reprimir a transcrição. A HC2 tem maior afinidade de ligação com o RNA sendo, portanto, mais eficiente do que HC1 em reprimir a tradução (KINT et al., 2010).

As Clamídias apresentam sistema secretor tipo III (TTSS) considerado essencial para sua virulência (Fig. 7) porque é usado como efetor de proteínas em células eucarióticas, que induzem a secreção de outra proteína recentemente descoberta, o fator ativo de qualidade da protease (CPAF), cuja função ainda desconhecida está relacionada a degradação de fatores de transcrição humanos necessários para o complexo principal de histocompatibilidade - MHC (HORN et al., 2004).

As proteínas PLS1 e PLS2, secretadas no lúmen de inclusão e que estão associadas com as membranas de inclusão, são eliminadas para o ambiente celular do hospedeiro promovendo a replicação bacteriana (JORGENSE; VALDIVIA, 2008). As Clamídias são adaptadas para viverem em inclusão celular onde ocorrem processos bioquímicos que ainda são desconhecidos.

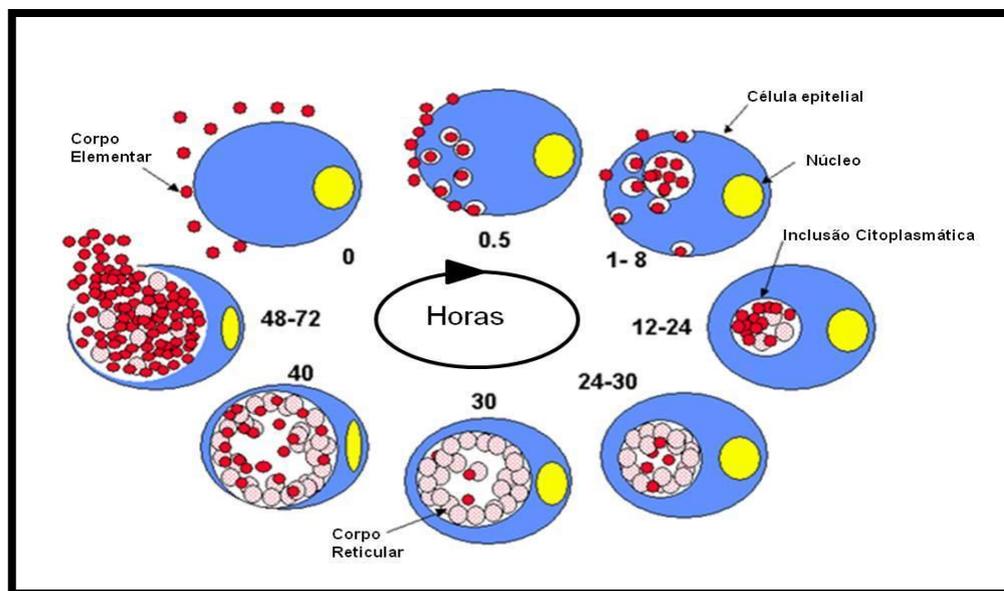
4.2.4 Ciclo Evolutivo

O ciclo de desenvolvimento e a predileção para causar infecções persistentes são características distintas das Clamídias. O seu ciclo de desenvolvimento vital bifásico é composto de doenças infecciosas e estágios não infecciosos, caracterizado por duas formas morfológicas, o CE, forma contagiosa, resistente ao ambiente extracelular, metabolicamente inativo e capaz de invadir o citoplasma celular e, a forma metabolicamente ativa e não contagiosa, o CR (BELLAND et al., 2003; LI et al., 2008; MOULDER, 1991).

O CE é uma partícula metabolicamente inativa com uma superfície rígida e membrana exterior reticulada dissulfeto, servindo para propagar a infecção de uma célula para outra e penetrar nas células do hospedeiro, onde inicia o metabolismo bacteriano e a conversão do CE para a forma com replicação intracelular do organismo, denominado CR (BELLAND et al., 2003; CLARKE, 2011; GIRALDO; SIMÕES, 2000; MARQUES; MENESES, 2005; LI et al., 2008).

A infecção se inicia(Fig.6) com a adesão do CE a sítios específicos de células epiteliais colunares não ciliadas ou cuboides, do hospedeiro susceptível à infecção, onde secretam proteínas para promover a sua internalização num vacúolo parasitóforo para o citoplasma celular, através do processo de fagocitose, pinocitose ou endocitose, mediada por receptores na superfície celular (BELLAND et al., 2003; BURTON, 2007; CLARKE, 2011; MOULDER, 1991; NEWTON; ANGELI; KRAJDEN, 2004; SAKA et al., 2011).

FIGURA 6 – Ciclo vital bifásico da *Chlamydia trachomatis*.



Fonte: Adaptado de http://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c1/C_trachomatisGenome.jpg.

Dentro de vacúolos da célula epitelial hospedeira, os CE se multiplicam protegendo-se dos mecanismos de defesa celular e originam inclusões citoplasmáticas características (BELLAND et al., 2003; CLARKE, 2011; MOULDER, 1991; NEWTON; ANGELI; KRAJDEN, 2004; SAKA et al., 2011). Nestas inclusões os CE aumentam de tamanho (0,3 μ para 1,0 μ), reorganizam-se e tornam-se metabolicamente ativos transformando-se em CR com 800 a 1.000 nm.

Cerca de duas a três horas depois os CR formam novos corpúsculos. Essa diferenciação de volta para CE envolve uma forma de transição, os corpos intermediários (CI), que podem ser observados em microscópio eletrônico, como CR com um nucleotídeo condensado. A reprodução se dá por fissão binária com duração de 8 a 24 horas. O processo completo tem duração de 7 a 10 dias (SAKA et al., 2011).

Os CR se condensam transformando-se em CE. O vacúolo intracitoplasmático fica repleto de CE e após 48-72 horas, a célula infectada se rompe liberando numerosos CE para infectar novas células (BELLAND et al., 2003; CLARKE, 2011; GIRALDO; SIMÕES, 2000; MARQUES; MENESES, 2005; LI et al., 2008).

4.3 PATOGÊNESE

A principal causa de cegueira evitável no mundo é o tracoma. A *C. trachomatis* cujos sorovares responsáveis pelo tracoma endêmico são A, B, Ba e C, também é o agente causal da conjuntivite inflamatória crônica (BARBEYRAC et al., 2007; DEAN et al., 2008; CAJAS-MONSON et al., 2011).

Cepas urogenitais de *C. trachomatis* sorovares D a K, não causam tracoma endêmico, mas podem, eventualmente, causar uma conjuntivite de inclusão autolimitada caracterizada por grandes folículos opalescentes relativamente raros em regiões endêmicas de tracoma (BURTON, 2007; CARLSON et al., 2008; HU et al., 2010).

Os Sorovares D, E, G e F que foram isolados de populações com tracoma, ao serem utilizados em modelos animais, desenvolveram infecção da conjuntiva com formação de *pannus* em 12% dos animais infectados, enquanto os sorovares A, B ou C, só produziram *pannus* em 0,5% dos infectados. O sorovar J produziu uma grave doença ocular quando comparado aos sorovares B ou C e o sorovar E, induziu uma resposta inflamatória conjuntival mais grave (DEAN et al., 2008).

Estudos realizados em diferentes regiões endêmicas para o tracoma evidenciaram associação da gravidade clínica do tracoma a infecções mistas microbianas com outras espécies *Chlamydiaceae* como as *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci* e *Chlamydia caviae*, imitando infecções agudas óculo-genitais por *C. trachomatis* dos seres humanos (ABBAS et al., 2009; CARLSON et al., 2008; DEAN et al., 2008; HU et al., 2010; BURTON, 2007). Esses achados sugerem a importância das três espécies na patogênese do tracoma e confirmam a associação dos sorotipos urogenitais com o tracoma em regiões endêmicas (DEAN et al., 2008).

Entrópio e triquíase apresentam outras etiologias além do tracoma e devem ser consideradas no diagnóstico diferencial. Conjuntivites virais como a provocada por adenovírus e conjuntivites bacterianas por *Staphylococcus aureus* e *Moraxella*, causam conjuntivite folicular semelhante ao tracoma ativo. Síndrome de Stevens-Johnson, esclerose sistêmica, lesões químicas e penfigóide muco-membranoso podem provocar conjuntivite cicatricial (BURTON, 2007; TAYLOR, 2009).

A conjuntivite alérgica embora seja de baixa gravidade pode levar a quadros de ceratoconjuntivite atópica com produção de cicatrizes na córnea e perda de visão. Quando associada com o tracoma, papilas gigantes e folículos na conjuntiva tarsal superior podem coexistir com exacerbação dos sintomas (BEZERRA; SANTOS, 2010).

4.3.1 Resposta Imunológica

A exposição progressiva a *C. trachomatis* confere proteção limitada contra reinfecção do tipo sorovar-específico que é atribuída em grande parte à MOMP, tornando comum as infecções recorrentes (LOOMIS; STARNBACH, 2002; BURTON; MABEY, 2009).

Após a penetração da *C. trachomatis*, os anticorpos circulantes da mucosa provavelmente se ligam aos CE extracelulares, neutralizando-os e bloqueando a capacidade destes de infectar e penetrar as células epiteliais colunares da conjuntiva. A liberação precoce de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células epiteliais após a infecção podem iniciar e manter um processo inflamatório crônico associado com o tracoma (LOOMIS; STARNBACH, 2002; NATIVIDAD et al., 2009).

As células apresentadoras de antígenos (APCD) presentes no local da infecção englobam os corpos elementares apresentando-os às Moléculas da classe II codificadas no complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células LT CD4+ são ativadas após o reconhecimento do MHC, que tanto pode inibir a replicação de *C. trachomatis*, como estimular a função protetora de outras células do sistema imunológico e inflamatório (LOOMIS; STARNBACH, 2002). No entanto, os CE que conseguem penetrar nas células epiteliais não expressam MHC classe II,

logo não são reconhecidos pelos linfócitos T CD4+. Os CR formados dentro da inclusão citoplasmática são inacessíveis aos anticorpos. Esta fase exige uma resposta imune mediada por interferon gama (IFN- γ) (LOOMIS; STARNBACH, 2002; KARI et al., 2009).

As células T CD4+ e T CD8+ da classe I do MHC apresentam funções efetoras capazes de limitar a replicação da *Chlamydia* e exercem efeitos protetores através da secreção de IFN- γ (LOOMIS; STARNBACH, 2002).

Os linfócitos T CD4+ são reguladores da atividade das células B e estimulam linfócitos T CD8+ específicos para *C. trachomatis*. As células T CD8+ atuam por estímulo do IFN- γ ou por lise celular das células infectadas. O IFN- γ pode regular o potencial fagocitário dos macrófagos e a expressão de moléculas de MHC aumentando a apresentação de antígenos bacterianos para células T CD4+ e T CD8+. Atividades mediadas por IFN- γ contribuem para a inibição do crescimento intracelular da *C. trachomatis* através da indução de Óxido Nítrico (NO), pela degradação de estoques intracelulares de triptofano e privação de ferro por diminuição de receptores da transferrina (LOOMIS; STARNBACH, 2002).

A *Chlamydia* induz a atividade fagocítica na célula a qual está ligada, ao mesmo tempo em que impede a união fago-lisossomo (BURTON; MABEY, 2009; BOBO et al., 1996). A infecção ocular se inicia usualmente pelas células do epitélio colunar da conjuntiva, onde se aderem a sítios específicos e são fagocitadas. A sobrevivência da *C. trachomatis* intracelular é dependente da resposta imune celular, caracterizada por um infiltrado de células inflamatórias e por liberação de citocinas pró-inflamatórias na conjuntiva (BURTON; MABEY, 2009; BOBO et al., 1996).

O processo inflamatório estimula a produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 1b (IL-1b), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-10) Interleucina 12 (IL-12) e importantes mediadores inflamatórios e cicatriciais, regulando resposta imunológica por células linfocitárias Th1 e Th2, estimulando a proliferação de vasos sanguíneos no local da infecção. As complicações decorrentes do processo infeccioso estão mais relacionadas à resposta imune do hospedeiro e

presença de mediadores químicos do que aos danos intrínsecos ocasionados pela bactéria (BENAVIDES et al., 2007).

Natividade (2009) e Dean (2008) observaram que a resposta imune inata no início da infecção por *Chlamydia* pode ter efeitos favoráveis e desfavoráveis para o desenvolvimento de sequelas irreversíveis sugerindo que os fatores genéticos determinantes podem existir entre os genes da imunidade inata.

O TNF- α pode ser um participante na resposta inflamatória iniciada pela infecção por *Chlamydia* do tipo Th1 e na ação pró-inflamatória que parece estar associada com manifestações inflamatórias inicial ou folicular e cicatrizes, enquanto o IFN- γ pode desempenhar papel na persistência da infecção. As IL-2, IL-6 e IFN- γ estão elevadas nas infecções primária e secundária enquanto as IL-4 e IL-5 são indetectáveis (BOBO et al., 1996, BENAVIDES et al., 2007).

A IL-12 participa da ativação de células *natural Killer* (NK) e maturação de linfócitos citotóxicos. A IL-1 foi detectada em lágrimas de pessoas com inflamação folicular de tracoma em níveis muito maiores do que em pessoas sem a doença. Cicatrizes palpebrais causadas por reação de hipersensibilidade pela exposição contínua aos antígenos estão associadas a infecções crônicas recorrentes. O grau de cicatrização depende da interação entre carga e frequência da infecção, do tônus muscular orbicular dos olhos, do espessamento da placa tarsal, de fatores imunogenéticos e resposta imune celular (BOBO et al., 1996; BURTON; MABEY, 2009).

Estudo de cultura de células indicou que o IFN- γ também pode desempenhar um papel importante na persistência da infecção e continuação da doença, apresentando níveis baixos no tracoma cicatricial (BOBO et al., 1996).

O Fator Beta de Crescimento (TGF- β 1) é importante na cicatrização de feridas, mas a produção constante pode induzir fibrose patogênica. Está associado com todas as manifestações da doença, sobretudo com tracoma cicatricial (BENAVIDES et al., 2007).

Em um estudo sobre modulação da cicatrização patogênica em resposta ao trauma, anticorpos neutralizantes de TGF- β 1 foram eficazes em suprimir formação de cicatriz, sem interferir com a arquitetura dérmica normal e resistência à tração do tecido (BOBO et al., 1996).

Estudo realizado com ratos de laboratório infectados por monócitos e macrófagos com *Chlamydia*, demonstrou a associação de IL-1 e TNF- α , com o estado inflamatório estimulado por prostaglandinas, produção de colagenase e indução de fibroblastos (BOBO et al., 1996).

Níveis elevados de IL-2 e IL-12 foram associados com tracoma inflamatório intenso (TI), mas não com as sequelas da infecção como as cicatrizes. Um tipo Th1 parece estar associado com resposta inicial em manifestação com tracoma folicular, no entanto, não houve diferença de IL-12 com o estado da infecção (BOBO et al., 1996).

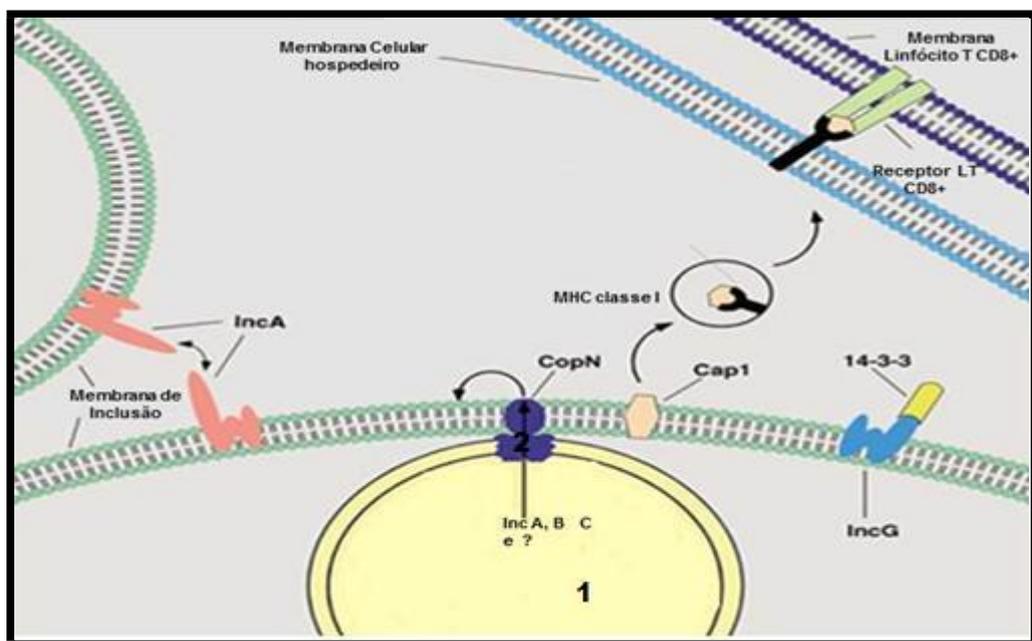
O tracoma inflamatório crônico é caracterizado por altas taxas de IL-8 e infiltração de neutrófilos do epitélio. Interleucina 8 (IL-8) e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (G-CSF) são dois mediadores pró-inflamatórios que manifestam uma resposta precoce do hospedeiro para infecção de *C. trachomatis* visando aumentar a imunidade inata essencial para a defesa celular, mas se não for controlada, causa dano citotóxico para o epitélio levando a complicações no tracoma cicatricial (NATIVIDAD et al., 2009) e elevação de células T citotóxicas / supressoras em comparação aos linfócitos T auxiliares (SKWOR et al., 2008).

SKWOR et al. (2008), analisaram quantitativamente, 25 citocinas e quimiocinas secretadas na mucosa conjuntival em uma população endêmica para o tracoma e o efeito que elas produziam sobre a infecção em cada grau da doença. Observaram no tracoma inflamatório intenso níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-10. A Presença da IL-10 no tracoma folicular (TF) e tracoma inflamatório (TI) é considerada fator de risco para progressão da doença. Nos casos de TS, os níveis de IFN- γ , TNF- α , e IL-12 encontram-se diminuídos quando comparados com TF e TI (SKWOR et al., 2008). As IL-6 e IL-15

encontram-se elevadas nos casos de TT. A IL-10 e IL-15 foram associadas a fatores de risco para o tracoma crônico (SKWOR et al., 2008).

Outras proteínas importantes associadas a virulência das Clamídias, são as proteínas de inclusão (Inc) (Fig. 7), cujo alvo é a membrana de inclusão das células do hospedeiro. As Inc são produzidas no início do ciclo de desenvolvimento intracelular das Clamídias, localizam-se na membrana de inclusão e estão envolvidas na interação do patógeno com a célula hospedeira levando a formação da inclusão. Apresentam um domínio hidrofóbico comum de aproximadamente 50-80 aminoácidos (ROCKEY et al., 2002; SETH-SMITH et al., 2009).

FIGURA 7 - Biologia intracelular de proteínas da *Chlamydia trachomatis* associadas a membrana de inclusão.



Fonte: Adaptado de Rockey et al., 2002.

Proteína da membrana: 1: Corpo reticular, 2: sistema secretor tipo III (exportações de proteínas de inclusão (incluindo IncA, B, e C) e CopN para a membrana de inclusão. As proteínas *Chlamydiais* na membrana de inclusão permite interações com outros fatores presentes no citosol celular. A porção citosólica de IncA interage com o IncA de outras membranas de inclusão que facilitam a fusão das vesículas homotípica. A porção citosólica de IncG interage com a proteína da célula hospedeira 14-3-3SS. Cap1 associa-se com a membrana de inclusão fornecendo as proteínas de acesso ao citosol de acolhimento. Cap1 é processado e apresentado via MHC classe I, estimulando as células T CD8+.

A presença de anticorpo de proteínas de choque térmico (*hsp60*) é um importante indicador de infecção, mas pode ser um fator de risco para progressão da doença (DEAN et al., 2008; HESSEL et al., 2001). Mediado por antígenos

apresentados por macrófagos e células de Langherans do epitélio da mucosa, promove inflamação aguda local que estimula as células T e B.

As Imunoglobulinas do tipo IgG induzem a liberação de enzimas de grânulos de neutrófilos. As IgG1, IgG2 e IgG3 ativam a via complementar e macrófagos que secretam mediadores adicionais de inflamação, podendo provocar uma série de resposta imune deletéria com dano tecidual e imunorreatividade nas formas ativas da doença. O fator de necrose tumoral alfa é liberado para remodelação tecidual (HESSEL et al., 2001).

4.3.2. Manifestação clínica

O tracoma é uma ceratoconjuntivite recorrente crônica causada pela *C. trachomatis* sorovares A, B, Ba e C que, acomete principalmente as crianças mais jovens, sendo grande o número de casos assintomáticos. Após um período de incubação que dura aproximadamente de 5 a 12 dias, a resposta inflamatória a primo-infecção da conjuntiva pela *C. trachomatis* leva a um quadro brando e autolimitado de conjuntivite, denominada conjuntivite de inclusão, sendo o prurido o sintoma mais relatado (BRASIL, 2001, 2008; HU et al., 2010; MACHADO et al., 2009).

Clinicamente o tracoma está classificado em doença ativa e doença crônica. O tracoma ativo acomete geralmente as crianças e se caracteriza por presença de folículos subepiteliais na conjuntiva tarsal superior, podendo ser acompanhado de hipertrofia papilar e evoluir para uma inflamação tracomatosa intensa com espessamento inflamatório e comprometimento vascular da conjuntiva (BURTON, 2007; HU et al., 2010). Após a cura esses folículos deixam na pálpebra afetada, depressões rasas conhecidas como “Fossetas de Herbert”, sinal patognomônico do tracoma (HU et al., 2010).

A inflamação causada pela *C. trachomatis* inicia-se sob a forma de uma conjuntivite folicular, com olhos vermelhos, lacrimejamento excessivo, dor, secreção, fobia à luz, hipertrofia papilar e infiltrado inflamatório difuso que se estende por toda a conjuntiva, particularmente na conjuntiva tarsal superior (BRASIL, 2001; JONES, 1975, 1980; HU et al., 2010).

Nos casos mais brandos pode ocorrer regressão espontânea dos folículos. Nos severos, os folículos crescem, evoluindo para necrose com formação de pequenos pontos cicatriciais na conjuntiva tarsal superior. Depois de repetidas reinfecções tem-se a formação de cicatrizes mais extensas. Há formação de entrópio e triquíase na pálpebra superior fazendo com que os cílios invertidos toquem no globo ocular causando dor constante e intensa fotofobia. As lesões resultantes deste atrito podem levar a opacificação corneana causando cegueira irreversível (BRASIL, 2001; 2008; HU et al., 2010; MACHADO et al., 2009).

Nos portadores sintomáticos, o tracoma inflamatório está associado a lacrimejamento, sensação de corpo estranho, prurido e discreta fotofobia. No tracoma ativo pode ocorrer irritação da córnea e perda de água (BURTON, 2007).

A menos que exista uma infecção bacteriana associada, o tracoma não apresenta secreção purulenta exuberante e os casos graves podem não apresentar sintomatologia proporcional às manifestações clínicas. No entanto, em áreas endêmicas de tracoma, observam-se reinfecções sucessivas da conjuntiva com uma resposta inflamatória exuberante e fenômenos fisiopatológicos que podem levar a graus variados de diminuição da acuidade visual até a cegueira (BRASIL, 2001, 2008; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTE, 2004; MACHADO et al., 2009).

A forma crônica do tracoma é decorrente de reinfecções repetidas que provocam cicatrizes palpebrais definitivas nas formas linear ou estrelada com fibrose, e complicações cicatriciais levando a distorção na anatomia ocular (BURTON, 2007).

As sequelas do tracoma cicatricial se manifestam em idade adulta e eventualmente leva à cegueira irreversível por opacificação da córnea. Este estado final da doença geralmente ocorre após a terceira década de vida depois de repetidas infecções pelos sorovares endêmicos do tracoma (BURTON, 2007; BAMANI et al., 2010; HU et al., 2010).

Estes sinais clínicos estão relacionados com a idade, onde se observa prevalência de tracoma inflamatório em crianças em idade escolar e pré-escolar, contrastando com a diminuição de tracoma inflamatório e prevalência de cicatrizes na conjuntiva com o aumento da idade (BURTON, 2007).

4.5 EPIDEMIOLOGIA

O tracoma é uma doença milenar que está associada aos seres humanos desde as civilizações mais antigas. No século XIX, tornou-se um importante problema de saúde pública principalmente na Europa e em outras partes do mundo para onde se disseminou (HU et al., 2010; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; PELICIONO et al., 1992).

A partir da primeira metade do século XX com o crescimento econômico, melhorias gerais dos padrões sanitários e condições de vida, a doença chegou a desaparecer na Europa e na América do Norte (HU et al., 2010; BURTON; MABEY, 2009).

Dois fatores são atribuídos para a queda na prevalência do tracoma ativo estimado de 84 milhões de casos para 40 milhões de casos atuais: a superestimação atribuída à China e à Índia, países superpopulosos que não dispunham de dados de prevalências atuais, e o crescimento socioeconômico (HU et al., 2010; BURTON; MABEY, 2009).

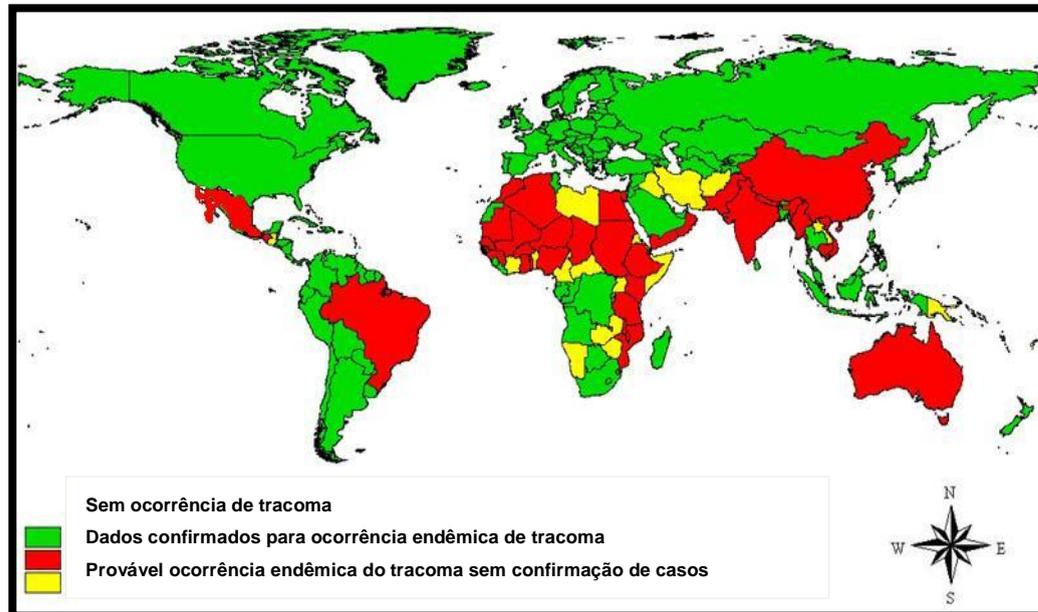
Contraopondo a forma ativa, a prevalência global de triquíase teve um aumento de 7,6 milhões de casos estimados em 2004 para 8,2 milhões de casos atualmente, sugerindo que a cicatriz conjuntival pode progredir, mesmo com redução da infecção da doença ativa (MARIOTTI, PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008; HU et al., 2010).

Atualmente a ocorrência do tracoma restringe-se quase que exclusivamente às populações residentes em regiões rurais, pobres e marginalizadas dos países subdesenvolvidos (BURTON; MABEY, 2009; HU et al., 2010; TAYLOR, 2009). Estas são áreas endêmicas para o tracoma onde vivem 1,2 bilhões de pessoas.

Hoje, o tracoma é encontrado em 57 países do mundo. Os países com as maiores taxas de prevalência (Fig. 8) estão na África Oriental, Oriente Médio e subcontinente indiano. No Sudeste da Ásia e África subsaariana, o tracoma é endêmico (BURTON; MABEY, 2009; HU et al., 2010; ; MARIOTTI, PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008; TAYLOR, 2009).

A Europa é o único continente que parece estar livre do tracoma (MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

FIGURA 8 - Mapa da distribuição global do tracoma, 2009.



Fonte: Adaptado de OMS, 2009. Um guia de gestores para programas de controle do tracoma.

A estimativa atual de pessoas com tracoma ativo é de 41 milhões, 8,2 milhões de pessoas com triquíase e mais de 7 milhões de pessoas cegas pelo tracoma (BURTON; MABEY, 2009; OMS, 2007; MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

A Etiópia e o Sudão apresentam as maiores taxas de prevalência de tracoma encontradas em mais de 50% das crianças menores de 10 anos e triquíase em até 19% dos adultos (ZHANG et al., 2010; OMS, 2006; POLACK et al., 2005).

As maiores taxas de detecção de tracoma ativo e triquíase estão nas áreas de savana da África Oriental, Central e Ocidental (HU et al., 2010), com 27,8 milhões de casos de tracoma ativo e 3,8 milhões de triquíase distribuídos entre 28 países do continente Africano, onde vivem 279 milhões de pessoas nas áreas endêmicas (MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-SSBAUMER, 2008).

A Etiópia, Índia, Nigéria, Sudão e Guiné concentram quase 50% da carga global de tracoma ativo, enquanto a China, Etiópia e Sudão são responsáveis pela metade da carga global de triquíase (MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

Estudo de base populacional realizado nos anos de 2004 e 2006, na China e na Índia, reavaliou a prevalência do tracoma em dez províncias chinesas e cinco estados indianos, sendo estimado para estas regiões 1,3 milhões e 4,5 milhões de casos de tracoma ativo, respectivamente (MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

No sul do Sudão, estudos encontraram taxa de detecção de doença ativa em crianças de até 80% e triquíase em um quinto da população adulta (NGONDI et al., 2005; KING et al., 2010).

No continente americano, México, Guatemala e Brasil apresentam casos confirmados de tracoma, correspondendo a 3% da população mundial. O custo gerado aos cofres públicos com a perda de produtividade e a deficiência visual foi de aproximadamente 5,3 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América (ABBAS et al., 2009; BURTON; MABEY, 2009; OMS, 2006).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde obtidos no inquérito nacional do tracoma no período de 2002 a 2007, revelaram alta prevalência desse agravo em todas as regiões do País (BRASIL, 2008). No Pará, foram identificados 35 Municípios prioritários com prevalência superior a 5% e taxa de detecção variando de 5,33 a 29,37% .

4.5.1 Carga global do tracoma e seu custo econômico

O tracoma pode ocasionar duas categorias de deficiência Visual: a Cegueira e a Baixa Visão, sequelas incapacitantes do tracoma conhecidas como Opacificação da córnea e Triquíase. Estas incapacidades visuais impactam drasticamente na vida do indivíduo, afetando-o psicologicamente, social e financeiramente (BURTON; MABEY, 2009; HU et al., 2010).

Embora a dor ocular e a fotofobia provocada pela triquíase, levem a uma incapacidade visual, sem opacificação da córnea, ainda não foi incluída como doença incapacitante (BURTON; MABEY, 2009). Esta inclusão provocaria um acréscimo de 50% na carga global do tracoma.

HU et al. (2010, p. 675, tradução nossa) declarou que “[...] o ônus da Infecção por *C. trachomatis* em uma comunidade é, provavelmente, a taxa de progressão da doença ao longo do tempo”.

De fato, triquíase continua a ocorrer nos adultos expostos ao tracoma e as cicatrizes do tracoma na conjuntiva aumentam com a idade, refletindo a natureza cumulativa dos danos (BURTON; MABEY, 2009; EMERSON et al., 2006; HU et al., 2010).

Complicações cicatriciais apresentam maiores riscos de evolução nos indivíduos com sucessivas reinfecções persistente de tracoma inflamatório grave (EMERSON et al., 2006; HU et al., 2010).

A opacificação da córnea é a seqüela mais grave do tracoma. Quando se desenvolvem no período de vida produtiva em indivíduos de países com Índice de Desenvolvimento Humano muito baixo, acarretam prejuízos financeiros ao país de 2,9 bilhões de dólares, com perda de produtividade além dos investimentos necessários ao tratamento medicamentoso e procedimentos cirúrgicos para triquíase (HU et al., 2010; MARIOTTI, PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008). Esta carga não inclui a perda de produtividade em trabalho informal, bem como o custo indireto relacionado com o cuidador do deficiente visual.

Nos Estados Unidos a perda de produtividade causada pelo tracoma incluindo a triquíase, foi estimada em U\$ 8 bilhões. Estudos realizados na tentativa de calcular a carga global do tracoma apresentaram limitações devido a ausência de dados reais de mortalidade prematura causada pela incapacidade visual decorrente do tracoma e dos anos de vida saudável perdidos por esta incapacidade (BURTON; MABEY, 2009).

4.5.2 Transmissão

A transmissão de infecções por *C. trachomatis*, entre indivíduos, ocorre por uma variedade de mecanismos dentro de uma comunidade endêmica (HU et al., 2010; BURTON, 2007).

O homem com infecção ativa na conjuntiva ou em outras mucosas é a única fonte de infecção, e os principais reservatórios das formas ativas são as crianças em idade pré-escolar (CHINEN et al., 2006; KOIZUMI et al., 2005), garantindo a manutenção da cadeia de transmissão (MACHADO et al., 2009). Em uma comunidade os grupos de maior vulnerabilidade são as crianças e as mulheres adultas cuidadoras das crianças menores, com quem mantém um contato mais íntimo.

As formas de transmissão são a direta, olho a olho ou mãos contaminadas com secreção ocular e a indireta, através de objetos contaminados e vestuário (BRASIL, 2001, 2005; CHINEN et al., 2006), ou por vetores mecânico através de insetos, como a mosca doméstica (*Musca domestica*) (DAMASCENO et al., 2009) e/ou a lambe-olhos (*Hippelates sp*).

O tracoma é considerado infecção intrafamiliar em áreas pobres, por aumentar a chance de disseminação da doença através do contato interpessoal e partilha de objetos de uso pessoal (BRASIL, 2001; JONES, 1975,1980).

Apresenta propriedade focal em nível de comunidade e família e sua característica infecciosa indica a necessidade de contato íntimo prolongado para a transmissão da infecção, onde a maioria dos casos de tracoma ativo ocorre dentro do lar (HU et al., 2010).

4.5.3 Fatores de risco

Os fatores de riscos potenciais para tracoma estão classificados em ambientais, socioeconômicos e comportamentais. Agrupamento familiar, infecções em crianças menores, limitação de água para uso doméstico, reinfecções entre comunicantes, presença de secreções óculo-nasais em rostos sujos, principalmente em crianças, presença de vetores mecânicos nas faces das crianças infectadas e

ambientes com sujeira, são os principais fatores de risco em áreas endêmicas associadas ao tracoma (HU et al., 2010; TAYLOR, 2009).

Embora a pobreza por si só não seja uma causa de tracoma, populações que vivem na pobreza estão mais susceptíveis à infecção devido aos fatores de exposição como higiene inadequada, falta de saneamento básico e de moradia (WRIGHT; TURNER; TAYLOR, 2007).

Mpyet, Goyol e Ogoshi (2009), demonstraram que todos os fatores de risco acima mencionados foram significativos para a presença de tracoma, sendo os mais importantes a presença de moscas em faces sujas, aumentando o risco de tracoma em até quatro vezes, e a falta de sanitário nas residências. O aumento da densidade de moscas na comunidade está relacionado ao hábito de evacuar a céu aberto.

Prevalências altas de tracoma têm sido encontradas em regiões secas, com escassez de água. A disponibilidade de água potável supostamente permitiria uma melhor higienização e redução da carga de infecção. Hábitos de higiene pessoal rotineiro como lavagem de rosto e a redução de tracoma têm sido relatados por alguns pesquisadores (HU et al., 2010; BURTON, 2007).

Em regiões endêmicas para o tracoma as crianças com tracoma ativo, geralmente apresentam infecções e secreções óculo-nasais. A escassez de água, a falta de higiene facial e a presença de mosca é frequentemente observada em contato com os olhos, alimentando-se destas secreções (BURTON, 2007).

Intervenção na Tanzânia para estimular a higiene facial comprovou que as crianças que aderiram ao novo hábito ficaram menos propensas a ter tracoma inflamatório grave (HU et al., 2010).

Outro fator potencial de risco é a secreção óculo-nasal produzida na forma clínica do tracoma inflamatório intenso tornando-se uma via importante de transmissão através do contato direto por mãos contaminadas, contato físico e/ou através de compartilhamento de objetos pessoais, como toalha, lençol, etc. com essas secreções (HU et al., 2010; BURTON, 2007).

Vetores mecânicos como as moscas domésticas (*M. sorbens*) é outro fator de risco ambiental facilitador da transmissão da infecção tracoma (HU et al., 2010). Comunidades que não dispõem de banheiros biológicos, comumente apresentam alta população desses vetores, cuja ração preferencialmente são fezes humanas e/ou de animais e secreções purulentas.

O tracoma é uma infecção que está associada à idade, onde se observa que as formas TF e/ou TI são predominantes nas crianças enquanto sequelas cicatriciais se tornam mais frequente com o aumento da idade (BURTON; MABEY, 2009; HU et al., 2010; MARIOTTI, PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

O tracoma ativo afeta, principalmente mulheres e crianças. O gênero feminino apresenta maior prevalência de complicações de tracoma cicatricial (TS) e opacificação da córnea (CO) devido a maior exposição com o reservatório de infecção que são as crianças pequenas (BURTON; MABEY, 2009; MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008).

Correntes migratórias humanas para regiões endêmicas, vidas em comunidades populosas ou casas lotadas com vários membros, onde o contato íntimo é maior, facilitam a contaminação domiciliar (BRASIL, 2001; BURTON; MABEY, 2009).

A saúde ocular e o sistema imunológico dos indivíduos com desnutrição, linfadenia e hipovitaminose A, são fatores importantes que devem ser considerados (ABBAS et al., 2009).

4.6 DIAGNÓSTICO DO TRACOMA

4.6.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico do tracoma é essencialmente clínico. O Ministério da Saúde adotou a classificação feita por Thylefors et al. (1987), preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente pela simplicidade diagnóstica e implicações epidemiológicas, onde se utiliza de uma cartela de gradação que se baseia na presença ou ausência de um ou mais dos cinco sinais chaves do tracoma.

A inflamação tracomatosa provoca na conjuntiva duas reações que podem ocorrer simultaneamente, os folículos e a infiltração difusa.

A identificação desses sinais tem grande importância, pois representam o estado epidêmico do tracoma na população, priorizando os indivíduos de uma coletividade para as estratégias de tratamento farmacológico e procedimentos cirúrgicos quando necessários (BRASIL, 2008; BARBEYRAC et al., 2007).

A presença de indivíduos com tracoma folicular (TF) ou tracoma inflamatório (TI) representa a prevalência de doença ativa. O tracoma intenso com infiltração e espessamento difuso da conjuntiva significa agravamento da doença que requer tratamento imediato para se prevenir os estados de cronicidade como triquíase tracomatosa (TT) e Opacificação Corneana (CO). Este diagnóstico é realizado por meio de exame ocular externo, com a utilização de lupa binocular de 2,5 vezes de aumento em ambiente com boa iluminação natural e uma fonte de iluminação artificial (BRASIL, 2008).

4.6.2 Diagnóstico laboratorial

Entre os métodos laboratoriais disponíveis (Tab. 3) para a detecção direta da *Chlamydia* está a cultura, a imunofluorescência direta (IFD) e indireta (IFI), o ensaio

Tabela 3 - Comparação das principais técnicas de detecção da *Chlamydia trachomatis*, utilizando como referência o padrão ouro expandido.

	Detecção de antígenos			Detecção de ácidos Nucleicos			
	Cultura	IFD	EIA	Sonda	PCR	LCR	TMA
Sensibilidade Clínica							
Prevalência <5%	70-80-	75	62-71	75	90	87	ND
Especificidade clínica	100	99,8	99,5	99,9	96-100	99-100	>99
Material biológico	Qualquer	End, Ure, Oc	End, Ure, Oc,U	End, Ure,Oc	End, Ure, Oc,U	End, Ure, Oc,U	End, Ure, Oc,U
Viabilidade	S	N	N	N	N	N	N
Tempo de execução	48-72h	40min.	2-3h	2-3h	4-5h	4-5h	4-5h
Teste confirmatório	N	N	S	S	N	N	N
Reação cruzada	N	S	S	N	N	N	N
Equipamento	N	N	S	S	S	S	S
Contaminação	N	N	N	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição

Fonte: Adaptado de Seadi et al., 2001.

End: Endocérvice, Ure: Uretral, Oc: Ocular, URI: Urina, S: Sim, N: Não.

imunoenzimático (EIE), a micro imunofluorescência indireta (MIF) e as técnicas de detecção de ácidos nucleicos (NAAT), que apresentam maior sensibilidade (BRASIL, 2001; GONÇALVES et al., 2009; MARQUES; MENESES, 2005; OLIVEIRA et al., 2008; SACHDEVA et al., 2009; SEADI et al., 2002) .

O padrão ouro para o diagnóstico laboratorial do tracoma é a cultura, que apresenta alta sensibilidade, especificidade e maior positividade nos casos de tracoma ativo e severo (JONES, 1995; OLIVEIRA et al., 2008).

A cultura utiliza células McCoy e após 72 horas de cultivo, a visualização do crescimento microbiano é realizada através da IFD para a identificação dos CE e CR ou coloração de Giemsa ou Iodo.

Por se tratar de uma técnica de procedimento complexo, demorado e caro a cultura tem sido substituída por outros métodos não culturais como os métodos de amplificação de ácidos nucleicos, que não estão disponíveis para uso na rotina das ações de vigilância epidemiológica do tracoma (MILLER, 2006; OLIVEIRA et al., 2008)

Os testes diagnósticos de detecção direta de antígenos e a patogênese da infecção por *C. trachomatis* estão relacionados à detecção do antígeno contido no Lipopolissacarídeo (LPS), comumente encontrado no CE e no MOMP (GIRALDO; SIMÕES, 2000; SEADI et al., 2002; TAYLOR, 2009).

A IFD permite identificar a *C. trachomatis* por meio de anticorpos monoclonais conjugados à fluoresceína, que reagem com a proteína principal da membrana externa, ligando-se aos corpos de inclusão extracelular e, ao microscópio de imunofluorescência são visualizados sob a forma de pequenos pontos arredondados de contorno regular, com uma cor verde maçã fluorescente. A sensibilidade e especificidade ficam em torno de 85% e 98%, respectivamente. Ligações inespecíficas podem ocorrer levando a resultados falso-positivos (OLIVEIRA et al., 2008; SEADI et al., 2001).

Anticorpo mono ou policlonais marcados com enzimas são utilizados nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de antígenos presente na parede celular

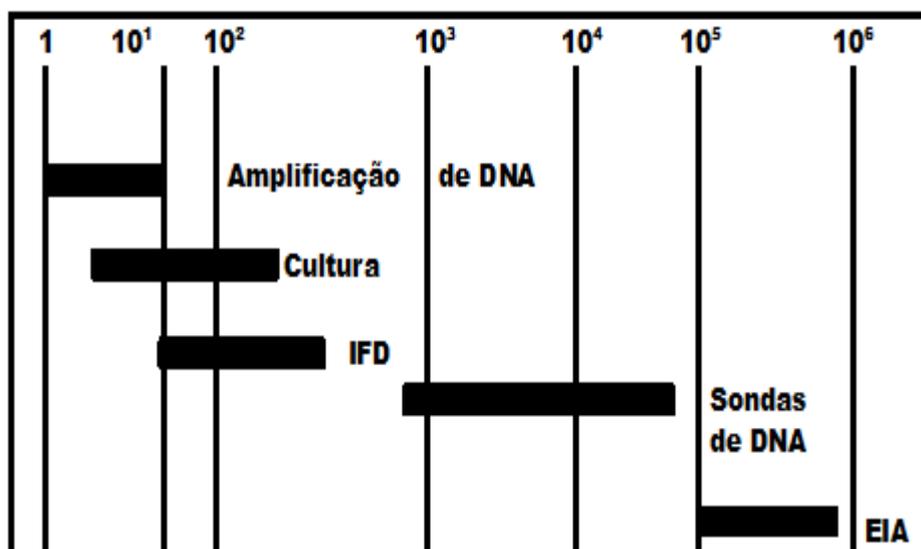
da bactéria (MICHELON et al., 2005). Os anticorpos anti-LPS podem levar a reações cruzadas com outras espécies de bactérias Gram-negativas. O produto final é visualizado por espectrofotometria, fluorescência ou quimiluminescência e a sensibilidade é estimada entre 61,9% a 75,3% (SEADI et al., 2001).

Os anticorpos monoclonais da MOMP são espécie e subespécie-específicas, por isso são utilizados para a sorotipagem através de painéis de anticorpos (GIRALDO; SIMÕES, 2000; SEADI et al., 2001; TAYLOR, 2009).

A Imunofluorescência indireta, Micro imunofluorescência indireta e Ensaio imunoenzimático indireto, são testes sorológicos utilizados para a detecção de anticorpos contra o antígeno LPS presentes nas duas formas de desenvolvimento da *Chlamydia*, os CE e CR. Estes testes apresentam a desvantagem de reações cruzadas com outras espécies de Clamídias sendo mais indicado para estudos epidemiológicos e infecções sistêmicas (MICHELON et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008; SEADI et al., 2001).

A grande vantagem dos métodos moleculares é que estes aumentam a capacidade de diagnóstico para esta doença, com uma sensibilidade de 98,0% - 99,9% em relação aos demais métodos (Fig. 9).

FIGURA 9 - Comparação dos limites de detecção do número de Corpo Elementar, em escala logarítmica entre as diferentes técnicas utilizadas.



Fonte: Adaptado de Seadi et al., 2001.

A sensibilidade desses testes de ampliações de DNA são 20% maior do que na cultura de células, imunofluorescência direta e ensaios imunoenzimáticos (OLIVEIRA et al., 2008; BLACK, 1997). Podendo ser realizados através de sondas de DNA ou de amplificação de ácidos nucleicos (SEADI et al., 2001).

As sondas de DNA utilizam sequências complementares ao RNA ribossomal 16S do genoma da *Chlamydia*, marcadas com éster de acridina que hibridizam com o DNA da *C. trachomatis*, onde são absorvidas por magnetismo. A reação é quantificada com o emprego de luminômetro (MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2001).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem alta especificidade e sensibilidade, além da capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pequena quantidade de material (MESQUITA et al., 2001), sendo capaz de detectar até uma cópia de DNA de qualquer célula (LIMA et al., 2007).

A inovação tecnológica da PCR em tempo real apresenta vantagens de gerar resultados quantitativos, com maior sensibilidade, precisão e exatidão, bem como uma análise mais rápida, o que a torna superior aos outros métodos de PCR padrão que apresentam apenas resultados qualitativos sem a necessidade do uso de células (CDC, 2002; MIRANDA et al., 2004; MOULDER, 1991). A quantificação de DNA e RNA ocorre precisamente e com maior reprodutibilidade porque determina os valores durante a fase exponencial da reação. A sensibilidade torna possível a utilização de amostras mínimas, como pequenos resíduos de sangue, tecido, ou partes de uma única célula (MOULDER, 1991; MIRANDA et al., 2004). O tempo necessário para produzir um resultado é de aproximadamente duas horas, enquanto outras técnicas requerem mais tempo para o processamento do material (OLIVEIRA et al., 2008).

Vários testes comerciais de amplificação de ácidos nucleicos estão disponíveis no mercado. Empregam variadas técnicas e utilizam diferentes alvos de sequências para a amplificação de ácidos nucleicos. As técnicas mais empregadas são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Reação da Cadeia da Ligase (LCR) e Ensaio de Amplificação Mediada por Transcrição (TMA). Esta última tem como alvo o RNA ribossomal da *Chlamydia*, enquanto a PCR e LCR o alvo é o gene *ompA*

que codifica a proteína principal da membrana externa (MOMP) ou o plasmídeo críptico (BLACK, 1997; MICHELON et al., 2005). As PCR cujos alvos são dirigidos ao plasmídeo da *Chlamydia*, são mais sensíveis, pois contém de sete a dez cópias de DNA, enquanto a PCR dirigida ao gene *ompA* que codifica a proteína Momp, dispõe de uma só cópia (MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2001).

Os testes comerciais de amplificação de DNA aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para detecção de *C. trachomatis* são: a *polymerase chain reaction* (PCR) (Amplicor *C. trachomatis* Assay – Roche Molecular Systems), a *ligase chain reaction* (LCR) (LCX *C. trachomatis* Assay–Abbott Laboratories) e o *transcription-mediated amplification assay* (TMA) (AMP-CT Assay, Gen-Probe Amplified *C. trachomatis*) e, APTIMA Combo 2 (Gen-Probe) e, amplificação por deslocamento da cadeia (SDA) Probe Tec (BD Diagnostics Systems) (LIMA et al., 2007; SEADI et al., 2002; BLACK, 1997).

O alto custo é a grande desvantagem destes métodos, eles são mais caros (SEADI et al., 2002; BLACK, 1997; MICHELON et al., 2005). Vários estudos têm sido publicados mundialmente onde são utilizados testes de PCR com protocolos desenvolvidos por pesquisadores independentes, os quais são denominados de PCR *in house* ou *home brew* como estratégia de baratear os custos dos métodos de detecção de ácidos nucleicos (ANDREASEN et al., 2008; FERRAZ et al., 2010; JALAL et al., 2007; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004), haja vista os *kits* de PCR comerciais, estarem inacessíveis aos laboratórios públicos, principalmente nos países em desenvolvimento, que não dispõem desta tecnologia para uso na rotina dos laboratórios.

4.6.2.1 Diagnóstico diferencial

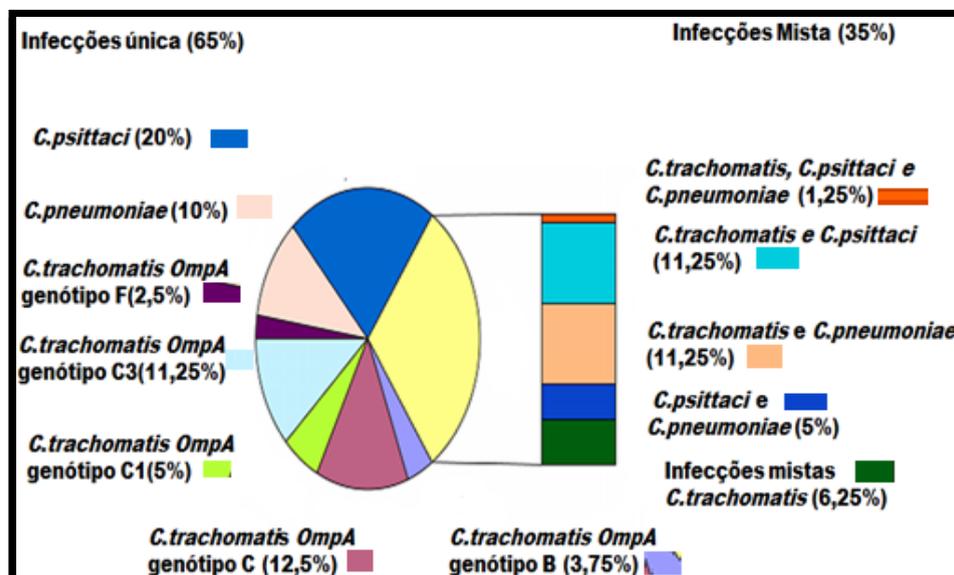
Conjuntivites causadas por vírus (adenovírus) e bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Moraxella* e *Corynebacterium diphtheriae*) podem produzir uma conjuntivite folicular crônica com uma aparência semelhante ao tracoma ativo (BURTON, 2007; RAJAK; O COLLIN; BURTON, 2012). Além disso, condições de severidade autoimunes como pênfigo muco-membranoso, síndrome de Stevens-Johnson, esclerose sistêmica, lesões químicas, drogas, ceratoconjuntivite atópica e doença

linear igA causam conjuntivite cicatricial (BURTON, 2007; RAJAK; O COLLIN; BURTON, 2012).

Em áreas não endêmicas para o tracoma, a maioria dos casos de entrópio ocorre devido a mudanças involucionais. Epiblefaro (sobreposição de pele orbicular por cima da pálpebra tarsal inferior) e distiquíase (linha adicional de cílios decorrentes dos orifícios da glândula Meibomiana) são dois distúrbios congênitos raros de cílios tocando os olhos (BURTON, 2007).

Para Dean et al. (2008), em regiões tracomatosas, infecções com sorovares sexuais de *C. trachomatis* e outras espécies *Chlamydeacea* como, *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pneumoniae* não são consideradas na etiologia da doença ocular, portanto não são testadas. Em estudo realizado no Nepal, (Fig. 10) foram identificados indivíduos com infecções mistas com as espécies *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* e infecções com os sorovares genitais E e F.

FIGURA 10 - Infecções por *Chlamydiaceae* em uma região endêmica de tracoma no Nepal, utilizando a genotipagem *ompA* e gene 16S rRNA.



Fonte: Adaptado de Dean et al., 2008.

As percentagens indicadas após cada espécie ou genótipo *ompA* representam o número de indivíduos infectados com as espécies ou genótipos dividido pelo número total de indivíduos infectados com qualquer outra espécie ou genótipo *ompA* (n = 80). Infecções mistas incluído genótipos *ompA* de *C. trachomatis*, genótipo (s) de *C. trachomatis* com outras espécies *Chlamydiaceae*, e co-infecções com *C. psittaci* e *C. pneumoniae*.

Cepas urogenitais de *C. trachomatis* causam uma conjuntivite de inclusão de adultos, caracterizada por grandes folículos opalescentes (BURTON, 2007). Vários estudos de *swab* ocular têm isolado os sorotipos D, E, F, G, J e K de modelos animais e humanos associados com formação de *pannus*, achado comum no tracoma (DEAN et al., 2008; KESE et al., 2011).

4.7 TRATAMENTO E CONTROLE DO TRACOMA

A partir de 1987 a OMS adotou o sistema simplificado de classificação para o diagnóstico clínico do tracoma. O esquema de gradação das fases de tracoma desenvolvido por Thylefors et al. (1987), para uso de profissionais de saúde, facilitando o trabalho de campo em pesquisas de tracoma (NGONDI et al., 2009).

Em 1997, A OMS estabeleceu como meta a eliminação global do tracoma até o ano 2020. Para alcançar este objetivo, os países membros formaram a aliança GET 2020 visando definir estratégias e dar subsídios ao programa. A aliança recomenda a utilização da estratégia *SAFE*, composta pelos componentes, cirurgia palpebral ("S"), administração de antibióticos em massa ("A"), limpeza facial ("F"), e melhoria sanitária ("E"), como ferramenta de saúde pública que combina tratamento (cirurgia e antibióticos) com profilaxia (limpeza facial e melhoria ambiental) à população já afetada, na prevenção de sequelas do tracoma como cicatrizes conjuntival e triquíase, responsáveis pela cegueira irreversível (BURTON; MABEY, 2009; NGONDI et al., 2009; POLACK et al., 2005).

Países membros da OMS têm sido estimulados a implantar a ferramenta *SAFE* com base na prevalência estimada das formas clínicas do tracoma. Para taxa de detecção de tracoma ativo $\geq 10\%$ é recomendado os componentes "A", "F" e "E" promoção de melhoria de higiene e saneamento. A presença de TT recomenda tratamento cirúrgico ("S") e o número de CO, demonstra o impacto do tracoma como doença causadora de baixa visão ou cegueira (BAMANI et al., 2010; BRASIL, 2008; EMERSON et al., 2006; OMS, 2006).

Os Programas de controle do tracoma se baseiam na prevalência da doença dentro de um país e a falta de dados populacionais e de estudos de prevalência

minam esforços globais de controle da doença (NGONDI et al., 2009; POIACK et al., 2005).

Quando há erradicação do tracoma ativo em uma comunidade, apenas as formas crônicas da doença (TS, TT e CO), em indivíduos adultos, são encontradas, refletindo um passado de doença ativa, mas um futuro, provavelmente, livre de cegueira (BRASIL, 2008; LUCENA; CAVALCANTE, 2004; KING et al., 2010; OMS, 2006).

A OMS recomenda tratamento com antibiótico em toda a população de crianças com idade entre 1-9 anos, nos municípios ou localidades que apresentarem prevalência de tracoma ativo maior ou igual a 10% com pelo menos três intervenções anuais (CAJAS-MONSON, et al., 2011; POIACK et al., 2005), até a prevalência cair para menos de 5%. Nas comunidades com taxa de detecção inferior a 5%, recomenda-se o tratamento dos casos e comunicantes (BURTON; MABEY, 2009; HU et al., 2010; OMS, 2006).

Para o tratamento com antibiótico, duas drogas são recomendadas pela OMS: a pomada de Tetraciclina 1%, que deve ser aplicada duas vezes ao dia por 6 semanas ou Azitromicina oral dose única. Estudos têm demonstrado que o uso de Azitromicina oral em dose única é mais eficaz que a aplicação tópica de Tetraciclina no tratamento do tracoma (BURTON; MABEY, 2009; EMERSON et al., 2006; HU et al., 2010; OMS, 2006).

A Azitromicina não é recomendada para o controle do tracoma em menores de 6 meses e gestantes. Nesses casos a pomada de Tetraciclina é o tratamento de escolha para estes grupos.

Huguet, et al. (2010), realizaram estudo na população da República dos Camarões utilizando para tratamento em massa de crianças menores de 1 e de 10 anos, colírio de Azitromicina a 1,5%, obtendo queda na prevalência da doença ativa de 31,5% para 6,3%, comprovando que o colírio de Azitromicina é uma alternativa potencial de cura no tratamento do tracoma ativo em crianças menores de 1 ano e gestantes.

Para alcançar o objetivo de eliminação da triquíase tracomatosa em localidades com taxa de detecção igual ou superior a 1%, cuja meta é menos de um caso de TT por 1000 habitantes, cirurgias para triquíase em adultos acima de 15 anos, devem ser ofertadas (BURTON, 2007; KINT et al., 2009; OMS, 2006).

Na prevenção da cegueira provocada pelo tracoma, a OMS recomenda, também, a cirurgia como forma de eliminar a abrasão da córnea provocada pelos cílios, reduzindo a progressão da CO (OMS, 2006; MARIOTTI; PASCOLINI; ROSE-NUSSBAUMER, 2008). Estudo revelou que cirurgias para triquíase além do efeito protetor proporcionou conforto e melhora na acuidade visual (HU et al., 2010).

Em comunidades endêmicas, cirurgias regulares devem ser oferecidas aos portadores de triquíase independente da quantidade de cílios evertidos. A rotação bilamelar tarsal (BLTR), com incisão da pele, tem sido a técnica mais recomendada (BURTON, 2007; HU et al., 2010). No entanto, as cirurgias pós-triquíase apresentam taxa de recorrência de 20% durante os dois primeiros anos (BURTON, 2007).

Para triquíase leve outra opção de tratamento é a epilação que tem mostrado redução do risco de opacificação da córnea (BURTON, 2007; RAJAK et al., 2012) tendo sido recomendada por alguns programas, como primeiro tratamento para minimizar TT, sendo bem aceita pelos pacientes, no entanto não previne reinfecções futuras (RAJAK et al., 2012).

A promoção de lavagem facial e melhorias ambientais tem demonstrado efeito protetor contra o tracoma ativo sendo incorporadas à estratégia *SAFE* (BURTON, 2007; KINT et al., 2009; OMS, 2006).

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizada pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, entre janeiro e dezembro de 2011, em material coletado de lâminas de IFD obtidas no Inquérito epidemiológico de escolares da rede pública do Estado do Pará e arquivadas desde 2006.

5.2 POPULAÇÃO ALVO DO ESTUDO

O inquérito nacional do tracoma etapa Pará foi realizado em duas fases no período de maio a setembro de 2006. O tamanho amostral foi estimado em 7.200 escolares acrescido de 20%, para evitar perdas por transferências, desistência ou faltosos, considerando uma prevalência de 5% em todas as formas clínicas de tracoma e um erro máximo de 0,01% (BRASIL, 2004).

Foram examinados 6.908 estudantes que frequentavam da 1ª à 4ª série do 1º grau em escolas da rede pública distribuídas nos municípios componentes de 12 centros regionais de saúde (CRS), envolvendo 73 municípios e 98 escolas, do estado. As escolas foram sorteadas levando em conta o tamanho das cidades e o índice de desenvolvimento humano (IDH-M) do IBGE-2000. Somente escolares da rede pública do ensino fundamental, residentes em municípios com índice de desenvolvimento humano menor que a média nacional (0,764), participaram do sorteio amostral. Um total de 479 escolares apresentaram alguma forma de tracoma ativo (TF e/ou TI) e uma sub-amostra destes foi submetida à coleta de raspado tarsal da conjuntiva superior com *swab* tipo Dacron. A coloração e leitura das lâminas foram feitas pelo método de imunofluorescência direta (IFD) com anticorpos monoclonais por profissional treinado e capacitado neste tipo de diagnóstico no Laboratório Central do Estado do Pará (LACEN-PA).

O inquérito buscou o diagnóstico clínico do tracoma através de examinadores padronizados pelo Ministério da Saúde que após treinamento, no qual apresentaram concordância igual ou superior a 80%, realizaram exame ocular externo da margem palpebral da conjuntiva tarsal superior e córnea de ambos os olhos dos alunos das

escolas sorteadas, utilizando lupa binocular de 2,5 vezes, iluminação artificial e o esquema de gradação das fases de tracoma desenvolvido por Thylefors et al. (1987) (ANEXO A), adotado pela OMS, sendo considerado positivo, o exame concordante para dois examinadores, baseado na presença ou ausência de um ou mais dos cinco sinais chaves seguintes (BRASIL, 2011, 2004; WHO, 2006).

- Tracoma folicular (TF): 5 ou mais folículos na conjuntiva tarsal superior central exposta com diâmetro maior de 0,5 mm.
- Tracoma folicular intenso (TI): predominância de infiltração pronunciada da conjuntiva tarsal com redução dos vasos tarsais normais.
- Cicatrização conjuntival tracomatosa (TS): cicatriz na conjuntiva tarsal superior de aparência fibrótica esbranquiçada, com bordos retos, angulares ou estrelados.
- Triquíase tracomatosa (TT): presença de pelo menos um cílio atritando a superfície ocular ou a evidência de remoção recente de cílio invertido (epilação).
- Opacificação corneana (CO): pupila visivelmente obscurecida em pelo menos uma parte da margem papilar.

5.3 AMOSTRA DO ESTUDO

Foram analisadas 53 lâminas de IFD, cujo material foi proveniente de raspado tarsal de escolares com diagnóstico clínico do tracoma, identificados no exame clínico da conjuntiva do Inquérito nacional Etapa - Pará em 2006. Até o momento do estudo as amostras foram mantidas a -20°C, acondicionados em caixas porta lâminas, no LACEN-PA.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas neste estudo 53 lâminas coletadas no Inquérito Nacional do Tracoma realizado nos escolares provenientes da 1ª, 2ª, 3ª, 5ª e 6ª CRS do Estado do Pará.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas das análises laboratoriais quatro amostra, coletadas no Inquérito Nacional do Tracoma realizado nos escolares provenientes da 1º, 2º, 3º, 5º e 6º CRS do estado do Pará, nas quais não foi possível a recuperação de material biológico de uma amostra para o método de IFD e três para o método molecular.

5.6 ETAPAS DO ESTUDO

5.6.1 Levantamento das amostras

Para o levantamento das amostras foram consideradas as variáveis inerentes a cada amostra, como procedência, idade, gênero, forma clínica, data da coleta, celularidade da lâmina, número de corpúsculos e resultado da IFD que foram obtidas a partir das fichas de Inquérito de tracoma/ Busca Ativa de Casos (APÊNDICE A) mantidas no LACEN-PA, na sessão de Microbiologia e Micologia, Serviço de DST e Tracoma e das fichas de registro dos resultados de Laboratório (APÊNDICE B).

5.6.2 Reavaliação das lâminas de IFD

As 53 lâminas de IFD foram reavaliadas e foto documentadas, antes da extração do DNA, em conjunto com profissionais habilitados no diagnóstico do tracoma pela técnica de IFD.

Lâminas que apresentavam degradação do corante ,foram novamente submetidas a coloração pelo O kit da *Pathfinder Chlamydia trachomatis Direct Specimen* 30704 50 test BIO-RAD® pelo LACEN-PA e Instituto Evandro Chagas (IEC).

Foi utilizado microscópio de imfluorescência Zeiss, modelo Axioshophon na foto documentação. Para o diagnóstico utilizou-se a objetiva de 60x e para o registro fotográfico foi utilizada objetiva de 100 x.

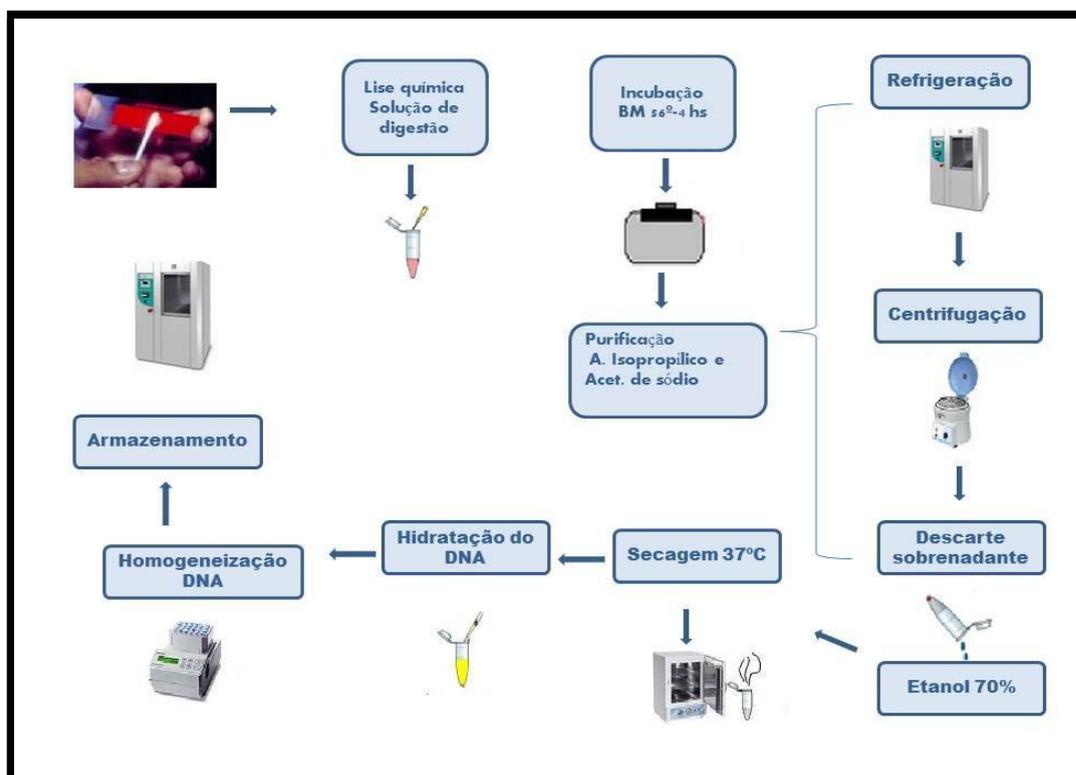
As lâminas contendo pelo menos 80 células colunares foram consideradas adequadas para a técnica de IFD.

5.6.3 Protocolo de extração de DNA bacteriano das amostras crio conservadas

Para obtenção do DNA (Fig. 11) das 49 lâminas do arquivo (amostras crio conservadas), utilizou-se a metodologia modificada de Furlaneto et al. (2007), onde foi otimizado, para cada amostra, 305 μ L de Solução de Digestão preparada com 150 μ L de Tampão de lise (300 mM/L Tris-HCl, pH 9.0; 100 mM/L EDTA; 1,25% de SDS; 20% de sucrose), 150 μ L de Tampão de homogeneização (Tris-HCl pH 8.0; NaCl 1 M; EDTA 0,5 M, pH 8.0; 5% de sucrose) e 5 μ L de Proteinase K (10 mg/mL).

Após a retirada da lamínula, o orifício central da lâmina de IFD foi lavado com a Solução de Digestão, transferindo-se 15 μ L da solução para a área delimitada pela circunferência central da lâmina, seguida de raspado do esfregaço com a própria lamínula. Essa operação foi repetida mais nove vezes, para a retirada completa do resíduo da lâmina. A solução do raspado da lâmina foi transferida para microcubo, previamente identificado, com capacidade de 1,5 mL. Os microtubos foram hermeticamente vedados e levados ao aquecimento em banho Maria (BM), à 56°C, por três horas, para a extração do DNA.

FIGURA 11- Representação esquemática do protocolo de extração e purificação de DNA a partir de lâminas crio conservadas de IFD.



Para precipitação do DNA extraído, a cada microtubo, foram adicionados 300 µL de álcool Isopropílico e 30 µL de acetato de sódio 3 M, pH 4,8 (Sigma), homogeneizado por inversão por 1 minuto e refrigerado por 30 minutos a -20°C, seguido de centrifugação por 13.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado por inversão, com retirada do excesso em papel toalha. Ao sedimento foi acrescentado 100 µL de etanol 70%, com homogeneização por inversão da solução e posterior centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Repetiu-se o procedimento de descarte do sobrenadante com remoção do etanol e secagem do microtubo em papel toalha, seguido de aspiração do excesso de álcool retido no fundo cônico do tubo, com o auxílio de pipeta e posterior secagem em estufa a 37°C, por aproximadamente 40 minutos. O processo foi finalizado com a reidratação do precipitado com 50 µL de TE (TRIS-EDTA 1X [10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA pH8]) seguido de agitação no termomix por 30 minutos e armazenamento do produto a -20°C.

Em cada sessão de extração, foi incluída uma lâmina de controle de IFD positiva para *C. trachomatis*, obtida de cultura de células McCoy, que acompanha o *kit* de IFD, corada e conservada nas mesmas condições das amostras.

5.6.4 Protocolo de detecção de DNA da β-globina humana

A pesquisa do gene da β-globina humana foi utilizada como controle de qualidade da extração do DNA genômico. Todas as amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando-se pares de iniciadores específicos para a β-globina, G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'), que gerou um produto de 270 pb (GREER et al., 1991). Para esta reação foi utilizado 3 µL de *Go Taq® Green Master Mix*, 2.5 µL de água, 0.25 µL dos *primers* G73 e G74 (cada) e 1 µL de DNA bacteriano, para um volume final de 7 µL. Os microtubos de 0,2 mL, contendo os reagentes, foram colocados em termociclador automático (*Thermo Hybaid/CE 3832*), onde teve início o primeiro passo da reação de 94°C por 5 minutos. Seguidos de 35 ciclos de amplificação de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 45. Após o último ciclo, a temperatura de polimerização (72°C) foi estendida por mais 10 minutos.

5.6.5 Protocolo de detecção de DNA de *Chlamydia trachomatis* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A *nested-PCR* para *C. trachomatis* foi realizada nos casos que apresentaram positividade para β -globina humana. Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa (Tab. 4) foram descritos por Jalal et al. (2007) que amplificam fragmentos de uma região altamente conservada do gene *ompA* da *Chlamydia trachomatis*.

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências de *Chlamydia trachomatis* com as respectivas localizações no gene *ompA*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Localização
P1	GACTTTGTTCGACCGTGTT	OMP199
P2	AGCRTATTGGAAAGAAGCBCCTAA	OMP657
P3	AAACWGATGTGAATAAAGARTT	OMP224
P4	TCCCASARAGCTGCDCGAGC	OMP617

Fonte: Adaptado de Jalal et al., 2007.

As reações de amplificação foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas utilizando reagentes da *Invitrogen*[®]. Para a primeira reação de PCR foi preparado uma mistura contendo 25 pmol de cada oligonucleotídeo (P1 e P2); 4 mM MgCl₂, 200 μ M de DNTp, 5 μ L de tampão de PCR 10X, 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase recombinante (*Invitrogen*[®]) e 5 μ L de DNA, para um volume final de 50 μ L. Um controle positivo e água livre de nuclease, como controle negativo, foram usados em cada reação.

Cada reação de PCR consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos onde a temperatura de desnaturação foi de 94°C por 40 segundos, anelamento de oligonucleotídeos a 54°C por 30 segundos, e extensão a 72°C durante 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em seguida foi realizada uma *nested-PCR* (2ª PCR) nas mesmas condições da 1ª PCR, aplicando os oligonucleotídeos P3 e P4 (Tab. 4) e 5 μ L de material genético da primeira PCR cuja região amplificada corresponde a 458 pb do gene *ompA* da *C. trachomatis*.

5.6.6 Eletroforese

Para visualização dos produtos da *nested-PCR* foram adicionados 0,05 µL de corante (azul de bromofenol 0,25% + xileno cianol 0,25% + sucrose 40%) a 10 µL de cada amostra amplificada. A mistura homogeneizada foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% contendo 0,375 X de *Syber Safe (Invitrogen®)*, em TAE 1x (Trisbase 1,6 M, Acetato de Sódio 0,8 M, EDTA-Na₂ 40mM/1L de água deionizada) nas condições de 90 Volts a 100 Ampéres, por aproximadamente uma hora. Utilizou-se como peso molecular *Ladder 1Kb (Invitrogen®)* contendo de 100 em 100 pares de base. As bandas foram visualizadas através do sistema de foto documentação de géis, em câmara escura com transluminador (*Vilber Lourmat*) duplo de 312 nm e luz ultra-violeta. O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA da *C. trachomatis* quando visualizada a banda correspondente ao fragmento de 458 pb.

5.6.7 Purificação de produtos da *nested-PCR*

Os produtos de PCR que amplificaram para *C. trachomatis* foram submetidos a purificação pelo *kit HiYield Gel/PCR DNA Mini kit (Cat. Nº YDF 100) - RBC Real genomics®*. Brevemente, foi transferido 30 µL do produto de PCR para um microtubo de 1,5 mL e adicionado 5x o volume de tampão *Df* (150 µL), a mistura foi agitada em *vortex* por 1 minuto, transferida para a coluna *Df*, encaixada no microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos. Descartado o filtrado, a coluna foi novamente lavada com 120 µL de tampão de lavagem, por 1 minuto, adicionado no centro da coluna, centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos, seguido de descarte do filtrado e transferência da coluna para outro microtubo de coleta com nova centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. Após esta etapa a coluna foi colocada em novo tubo, eluída com 20 µL de tampão de eluição por 2 minutos, finalizando com centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. O produto foi armazenado a - 20°C até seu uso no sequenciamento.

5.6.8 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o *kit Big Dye (Terminator v 3.1 Cycle Terminator- Applied Biosystems)*, de acordo com as

recomendações do fabricante, no Sequenciador automático *ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems)*. O protocolo utilizado em cada reação foi constituído de uma mistura contendo 2 µL de terminadores marcados (*terminator ready reaction mix-Applied Biosystems*), composto de *A-Dye Terminator, G-Dye Terminator, C-Dye Terminator, T-Dye Terminator*, dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂, Pirofosfato Termo-estável e *AmpliTaq DNA Polimerase, Fs*, 2 µL de tampão de sequenciamento 2,5 x (*Applied Biosystems*), 1 µL de produto de *nested-PCR*, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (os mesmos da *nested-PCR*), em reações separadas e água deionizada autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador (*Thermo Hybaid/CE 3832*), programado para 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

5.6.8.1 Precipitação do produto da reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento as amostras foram submetidas à precipitação com isopropanol e etanol, com a finalidade de retirar o excesso de didesoxirribonucleotídeos não incorporados na reação de seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 80% ao produto da reação, seguida de incubação por 15 minutos a Temperatura Ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70%, seguindo centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi novamente lavado com etanol 70%, sendo realizada nova centrifugação como descrito anteriormente. O sedimento foi seco em concentrador a vácuo (Concentrator 5031, Eppendorf, Germany) e ressuspenso em 10 µL de formamida.

5.6.8.2 Eletroforese capilar do DNA sequenciado

Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar no Sequenciador automatizado de DNA (modelo *Applied Biosystems*). Os fragmentos de DNA marcados com corantes fluorescente se movem através de um feixe de laser até atingir o eletrodo positivo, onde o dispositivo de detecção óptica detecta a fluorescência, converte o sinal de fluorescência em dados digitais, para em seguida, registrá-los em um arquivo AB1. Quando excitado pelo laser, cada corante emite luz

de comprimento de onda diferente e todas as quatro cores, correspondente as quatro bases, podem ser detectadas e distinguidas em uma injeção capilar.

5.6.8.3 Análise das sequências

As sequências do gene *ompA* foram alinhadas e editadas no programa BioEdit (versão 7.0.9; [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]). Sequências de genótipos da espécie *C. trachomatis* disponíveis no *GenBank* (Tabela 5) foram utilizadas para análise comparação com cada amostra testada usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) nucleotídeo-padrão de pesquisa no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://.ncbi.nlm.nih.gov> BLAST/).

Tabela 5 - Sequências do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* e de *Chlamydia pneumoniae* depositados no *Genbank* e utilizadas para comparação com as sequências do estudo.

Cepa	Genótipo	Nº de Acesso no <i>Genbank</i>
AHAR-1	A	DQO64279.1
B/Tunis-864	B	DQO64280.1
B/TW5	B	DQO64281.1
Ba/Apache -2	Ba	DQO64282.1
C/TW-3	C	DQO64283.1
D/UW-3	D	DQO64284.1
D/IC-CAL-8	D	DQO64285.1
E/Bour	E	DQO64286.1
F/IC-CAL3	F	DQO64287.1
G/392	G	DQO64288.1
H/580	H	DQO64289.1
I/UW-12	I	DQO64290.1
Ia/870	Ia	DQO64291.1
J/UW-36	J	DQO64292.1
K/UW-31	K	DQO64293.1
L1/440	L1	DQO64294.1
L1-DQ460732	L1	DQ460732.1
L1/DQ064294	L1	DQO64298.1
L1/M36533	L1	M36533.1
BH/BR-FJ428245	L1	FJ428245.1
L2/434	L2	DQO64295.1
L3/404	L3	DQO64296.1
CP/ NC002491	<i>C. pneumoniae</i>	NC002491

A árvore das sequências nucleotídica dos genes do *ompA* isolados deste estudo e daquelas importadas do *GenBank* foi inferido usando o método neighbor-joining com modelo de correção Kimura-2-parâmetros no programa MEGA (versão 5.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [<http://www.megasoftware.net/>]).

5.7 NORMAS ÉTICAS

O Inquérito Nacional de tracoma foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz (ANEXO B) e (ANEXO C) em Abril de 2002 e, a participação no projeto apresentou caráter de busca ativa de casos, sendo que, casos positivos de tracoma foram necessários para a capacitação (padronização) dos profissionais de saúde do Estado que atuavam no Inquérito Nacional etapa Pará.

As escolas sorteadas foram visitadas previamente para esclarecimento e orientação dos professores. Após a adesão dos educandários, todos os escolares das UPAS sorteadas, foram esclarecidos através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos (APÊNDICE C) para o exame clínico por profissionais padronizados pelo Ministério da Saúde, bem como seus familiares, sendo-lhes garantidas as informações necessárias sobre o tema da pesquisa, o anonimato dos dados coletados e o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento.

Nenhuma das comunidades do estudo havia recebido tratamento antibiótico para tracoma antes do inquérito. Os casos identificados de tracoma na forma ativa durante o inquérito foram tratados com 20mg/kg de Azitromicina oral em dose única, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (Portaria nº. 67, de 22/12/2005). O Inquérito Epidemiológico Nacional de Tracoma- etapa Pará, ocorreu no ano de 2006 sob responsabilidade da Secretaria de Estado de Saúde do Pará, que garantiu tratamento a todos os escolares clinicamente positivos e seus comunicantes (familiares), durante e após a efetivação do inquérito.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical (CEP/NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) protocolo Nº 043/201-CEP/NMT (ANEXO D) e CONEP (ANEXO E)

comprometendo-se o pesquisador, com a veracidade das informações prestadas no projeto (ANEXO F).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram inseridos em planilha do programa Excel (Office 2007), onde foram gerados gráficos e tabelas para a análise descritiva. As prevalências foram estimadas por variável (quantidade de CE presente por amostra, quantificação de DNA, quantidade de proteínas, celularidade, gênero e idade). A celularidade e a idade foram divididas em dois grupos: menor que 100 e maior ou igual a 100 células (≥ 100) para a celularidade e idade menor que 10 anos (< 10 Anos) e maior ou igual a dez anos (≥ 10 anos) foram os grupos formados com a variável idade.

Para estatística inferencial foram usados os testes do Qui-quadrado (X^2) e Teste Exato de Fisher para avaliar a diferença estatística entre as frequências das amostras. O grau de discordância entre os resultados dos métodos IFD e PCR foi avaliado pelo Teste McNemar. O grau de dependência da positividade para *Chlamydia trachomatis* com relação às variáveis independentes foi avaliado pela Regressão Linear Simples. Todos os testes estatísticos foram realizados com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) no programa BioEstat versão 5.0.3.

6 RESULTADOS

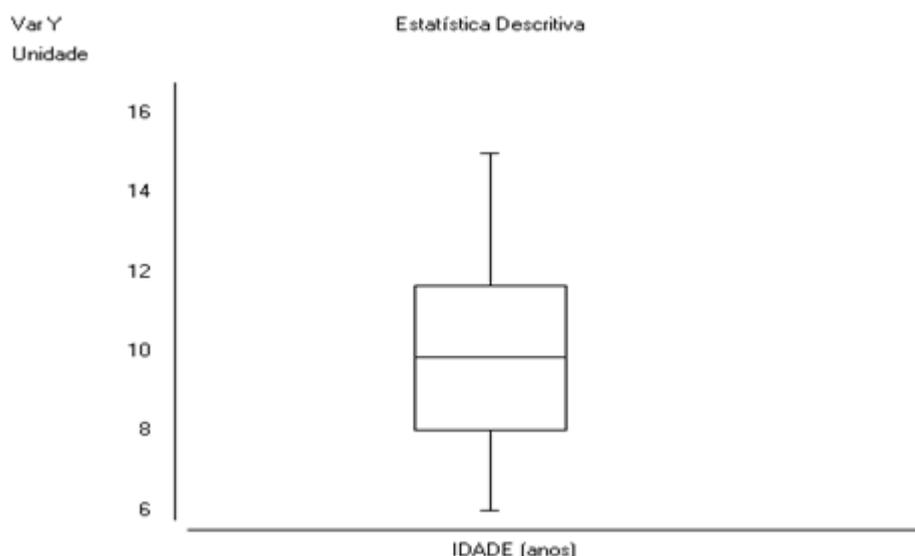
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DO ESTUDO

Um total de 53 escolares com quadro clínico de tracoma, moradores de municípios pertencentes à 1º CRS (n = 8), 2º CRS (n = 6), 3º CRS (n = 15), 5º CRS (n = 16) e 6º CRS (n = 8) do Estado do Pará, foram submetidos à coleta de material de raspado tarsal para a pesquisa de *C. trachomatis* por IFD, no período de março a setembro de 2006. Destes, 49,06% (n = 26) pertenciam ao gênero masculino e 50,94% (n = 27) ao gênero feminino (p = 1,0000).

A forma de tracoma folicular (TF) foi identificada em 77,36% (40/53) dos escolares com manifestação clínica de tracoma em um olho e 22,64% (12/53) de TF em ambos os olhos dos escolares examinados. Não ocorreram casos das outras formas clínicas do tracoma.

A idade desses escolares variou entre 6 e 15 anos, com média de 9,85 (DP \pm 1,78 anos) e mediana de 10 anos, com 50% dos escolares concentrados na faixa de 9 a 11 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Box Plot da média e desvio padrão das idades dos escolares que demonstraram tracoma e cujos materiais da conjuntiva foram coletados para análise da Imunofluorescência direta para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*.



A frequência dos casos clínicos coletados entre os gêneros dos escolares com idade igual ou superior a 10 anos (Tab. 6) não mostrou diferença significativa daqueles com idade abaixo de 10 anos ($p = 0,3229$).

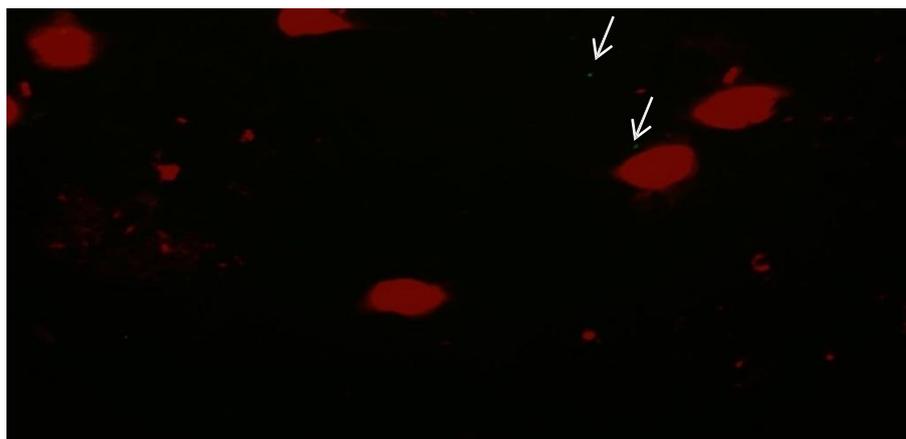
Tabela 6- Frequência de tracoma em escolares segundo o gênero e a idade.

Faixa Etária (em anos)	Gênero				Geral	
	Feminino		Masculino		n	%
	n	%	n	%		
6 — 9	14	52,0	9	35,0	23	43,4
10 — 15	13	48,0	17	65,0	30	56,6
Total	27	100,0	26	100,0	53	100,00

6.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

As 52 lâminas que apresentaram condições satisfatórias confirmaram o diagnóstico da IFD dado por ocasião do inquérito. Seguindo o critério de positividade adotado pelo Ministério da Saúde, com presença de cinco ou mais CE por lâmina (Fig. 12), a frequência da IFD positiva foi de 26,92% (14/52).

FIGURA 12- Foto documentação de lâmina de IFD de raspado tarsal superior contendo Corpos Elementares de *Chlamydia trachomatis* (setas).



Arquivo da pesquisa, obtido em microscópio Zeiss Axioshophon objetiva 100X no Laboratório de Doenças sexualmente Transmissível (DST) e tracoma da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

Das 53 lâminas coletadas para IFD, em uma houve degradação da amostra, mesmo após ter sido novamente corada para IFD.

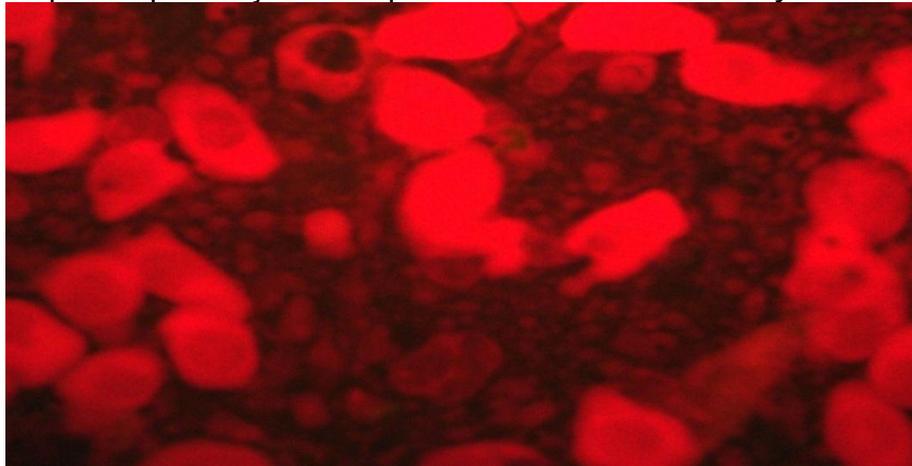
Do total de 52 lâminas (Tab. 7) analisadas, 69,23% (n = 36) apresentou celularidade maior ou igual a 100 células e 30,76% (n = 16) apresentou quantidade igual ou superior a 80 e menor que 100 células. Das 14 lâminas positivas para IFD, 85,71% (n = 12) tinham 100 ou mais células por campo e 14,29% (n = 2) tinham entre 80 e 100 células por campo ($p = 0,1788$).

Tabela 7 – Frequência para *Chlamydia trachomatis* segundo a celularidade e presença de Corpos Elementares.

CE	Quantidade de Células				Geral	
	≥100		≥80 e <100		n	%
	n	%	n	%		
Zero	4	11,1	7	44,0	11	21,0
Um	4	11,1	4	25,0	8	15,0
Dois	12	33,3	3	19,0	15	29,0
Três	3	8,3	0	0,0	3	6,0
Quatro	1	2,8	0	0,0	1	2,0
cinco	5	13,9	2	12,0	7	13,0
Seis	1	2,8	0	0,0	1	2,0
Sete	4	11,1	0	0,0	4	8,0
Dez	2	5,6	0	0,0	2	4,0
Total	36	100,0	16	100,0	52	100,0

Foram consideradas negativas 38 lâminas, por conterem menos de cinco CE. Destas, 11 não apresentaram CE (Fig. 13), oito continham um CE, em 15 foram visualizados dois CE, três lâminas apresentaram três CE e uma mostrou quatro CE.

FIGURA 13 - Foto documentação de lâmina de IFD de raspado tarsal superior negativa para a presença de Corpos Elementares de *Chlamydia trachomatis*.



Arquivo da pesquisa, obtido em microscópio Zeiss Axioshophon objetiva 100X no Laboratório de Doenças sexualmente transmissível (DST) e tracoma da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

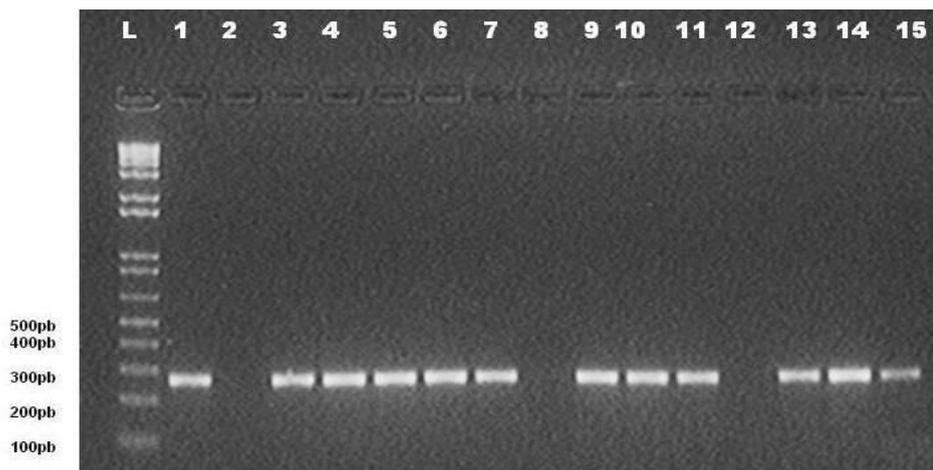
Das 52 amostras de lâminas de IFD analisadas neste estudo, a distribuição entre os gêneros foi de 50% (n = 26) para cada. Das 14 lâminas positivas para IFD, 64,28% (n = 9) pertenciam ao gênero feminino e 35,72% (n = 5) ao masculino ($p = 0,4412$).

A idade de dez anos foi a que apresentou o maior número dos casos positivos na IFD com 35,71% (5/14). Além disso, amostras coletadas de dois escolares com idades de oito, nove, 11 e 12 anos cada e em um escolar com 14 anos também positivaram por este método.

6.3 PCR PARA GLOBINA HUMANA

Das 52 lâminas adequadas para IFD e submetidas ao raspado para a extração de DNA, três foram excluídas da pesquisa molecular da *C. trachomatis* por não amplificarem o fragmento de 270 pares de base (pb) do gene β -globina humana pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR. Um total de 49 amostras foi submetido à pesquisa molecular da *C. trachomatis* por apresentar o fragmento do gene β -globina humana (Fig. 14).

FIGURA 14 - Foto documentação da amplificação do fragmento de 270pb do gene β -globina humana em gel de agarose a 2%.



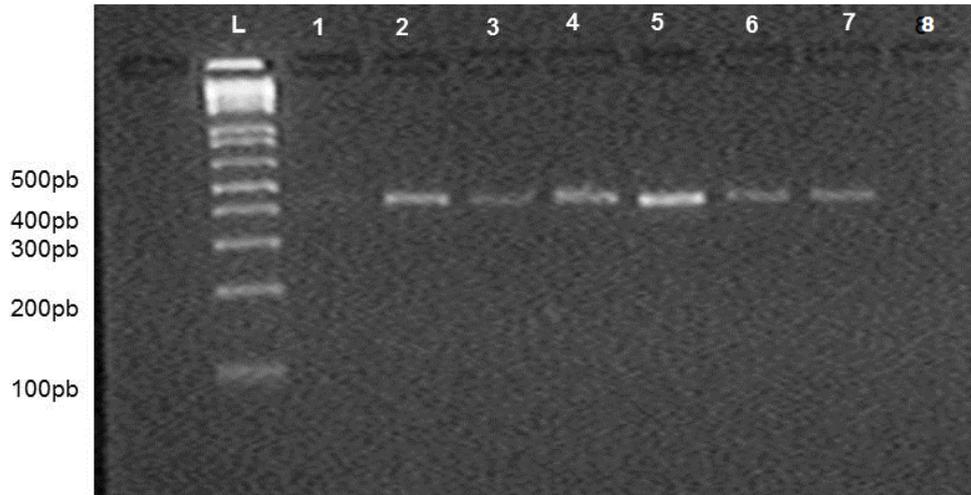
Arquivo da pesquisa, obtido em transluminador (*Vilber Lourmat*) no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

L: marcador de Peso molecular de 1Kb plus DNA *Ladder* (*Invitrogen*®), 1: controle positivo, 2: controle negativo, 3-7,9-11,13-15: amostras positivas e 8 e 12: amostras negativas.

6.4 NESTED-PCR PARA *Chlamydia trachomatis*

O teste molecular para *C. trachomatis* identificou que 49% (24/49) das amostras obtiveram resultado positivo por apresentar o fragmento específico do gene *ompA* da bactéria de 458 pb (Fig. 15).

FIGURA 15 - Foto documentação da amplificação do fragmento de 458pb do gene *ompA* de *Chlamydia trachomatis* em gel de agarose a 2%.



Fonte: Arquivo da pesquisa, obtido em transluminador (*Vilber Lourmat*) no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas. L: marcador de peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder* (*Invitrogen®*). 1 – 6: amostras positivas, 7: controle positivo, 8: controle negativo.

A representatividade nas 49 amostras testadas foi de 48,98% (n = 24) e de 51,02% (n = 25) para homens e mulheres, respectivamente. Das 24 amostras positivas para a pesquisa molecular 58,33% (n = 14) foram provenientes de escolares do gênero masculino e 41,67% (n = 10) foram provenientes de escolares do gênero feminino (p = 0,3187). O resultado do teste molecular da *C. trachomatis* foi independente da quantidade de DNA (p = 0,7404) ou de proteína (p = 0,6422) presente nas amostras, após extração de DNA.

Tabela 8 – Resultados da PCR para *C. trachomatis* quanto à presença de Corpos Elementares nas amostras.

EBS	Resultado PCR - Chlamydia				Geral	
	Negativo		Positivo		n	%
	n	%	n	%		
Zero	9	36,0	1	4,2	10	20,4
Um	6	24,0	2	8,3	8	16,4
Dois	7	28,0	8	33,3	14	28,6
Três	1	4,0	2	8,3	3	6,1
Quatro	0	0,0	1	4,2	1	2,0
cinco	2	8,0	5	20,9	7	14,3
Seis	0	0,0	1	4,2	1	2,0
Sete	1	4,0	2	8,3	3	6,1
Dez	0	0,0	2	8,3	2	4,1
Total	25	100,0	24	100,0	49	100,0

6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS DOIS MÉTODOS NA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Chlamydia trachomatis*

Considerando especificamente as 49 amostras clinicamente positivas para o tracoma e que foram analisadas pelas duas metodologias, as sensibilidades para a detecção do agente etiológico, por IFD e PCR foram de 28,57% (14/49) e 48,98% (24/49), respectivamente. Houve discordância nas frequências de resultados positivos entre as duas técnicas utilizadas, tendo ocorrido maior número de casos confirmados com a infecção por *C. trachomatis* pela metodologia molecular ($p = 0,0127$).

A quantidade de 100 ou mais células epiteliais por lâmina, identificadas na análise da IFD, foi encontrada em 20 (83%) das 24 amostras positivas de PCR para *C. trachomatis* e em 14 (56%) das 25 amostras negativas, determinando 1,1 vezes mais chance de resultado positivo da PCR em amostras que apresentarem 100 ou mais células ($p = 0,0426$) na análise da IFD.

A quantidade média de CE, identificados pela IFD foi de 3,88 nas amostras com resultados de PCR positivos e de 1,5 entre as amostras com resultados negativos, determinando 1,6 vezes mais chance de resultado positivo da pesquisa molecular de *C. trachomatis* quando identificado ao menos um CE na IFD ($p = 0,0011$).

As duas técnicas juntas confirmaram que 55,10% (n = 27) das 49 crianças investigadas apresentavam a infecção por *C. trachomatis*. Das 27 amostras com resultados positivos, 52% (n = 14) positivaram apenas pela PCR, 37,0% (n = 10) para ambas as técnicas, e 11,0% (n = 3) somente pela IFD (Tab. 9).

Tabela 9 – Análise comparativa dos métodos de IFD e PCR para *C. trachomatis* quanto à presença de Corpos Elementares e celularidade.

Celularidade				CE	Resultado IFD				Resultado PCR				Geral	
≥ 100		≥80 e < 100			Negativo		Positivo		Negativo		Positivo		n	%
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
3	9,1	7	43,7	Zero	10	27,8	0	0,0	9	36,0	1	4,2	10	20,4
4	12,1	4	25,0	Um	8	22,2	0	0,0	6	24,0	2	8,3	8	16,4
11	33,3	3	18,8	Dois	14	38,9	0	0,0	6	24,0	8	33,1	14	28,6
3	9,1	0	0,0	Três	3	8,3	0	0,0	1	4,0	2	8,3	3	6,1
1	3,0	0	0,0	Quatro	1	2,8	0	0,0	0	0,0	1	4,2	1	2,0
5	15,2	2	12,5	cinco	0	0,0	7	54,0	2	8,0	5	21,0	7	14,3
1	3,0	0	0,0	Seis	0	0,0	1	7,6	0	0,0	1	4,2	1	2,0
3	9,1	0	0,0	Sete	0	0,0	3	23,0	1	4,0	2	8,3	3	6,1
2	6,1	0	0,0	Dez	0	0,0	2	15,4	0	0,0	2	8,3	2	4,1
36	100	16	100	Total	36	100,0	13	100,0	25	100,0	24	100	49	100,0

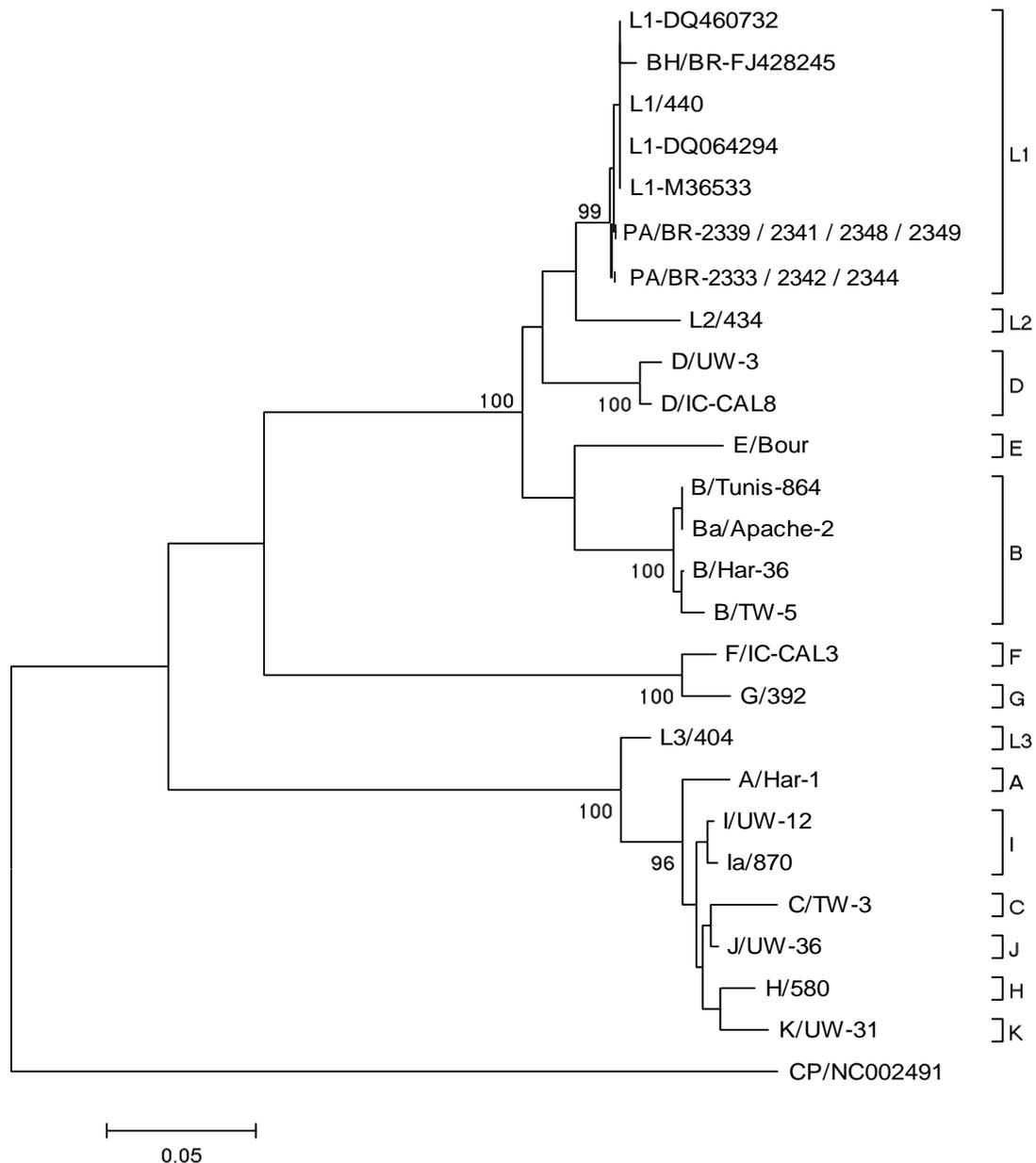
6.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE *ompA* DA *Chlamydia trachomatis*

Das 24 amostras que amplificaram o fragmento de 387 pb do gene *ompA* da *C. trachomatis* sete tiveram suas sequências nucleotídicas analisadas: PA/BR-2333 e PA/BR-2339 (1º CRS), PA/BR-2341, PA/BR-2342 e PA/BR-2344 (2º CRS) e PA/BR-2348 e PA/BR-2349 (5º CRS).

As amostras PA/BR-2339, PA/BR-2341, PA/BR-2348 e PA/BR-2349 foram idênticas entre si, assim como houve 100% de homologia entre as sequências PA/BR-2333, PA/BR-2342 e PA/BR-2344. A divergência entre esses dois grupos foi de 0,3% (APÊNDICE D). Todas as sete amostras agruparam, com *Bootstrap* de 99%, juntamente com o grupo de sequências depositadas no *Genbank* caracterizadas como genótipo L1 (Fig. 16), com homologia nucleotídica variando de 98,9% a 99,7%.

As sequências nucleotídicas da genótipo L1 das amostras do Estado do Pará demonstraram diversidades que variaram de 68,9% a 93,8% dos outros genótipos de *C. trachomatis* e de 62,7% a 62,9% da *C. pneumoniae* (APÊNDICE D).

FIGURA 16 – árvore filogenética das amostras de *Chlamydia trachomatis* isoladas de raspado ocular e sua relação com cepas de referência.



Fonte: Arquivo da pesquisa.

Árvore filogenética de sequências nucleotídicas do fragmento de 387 pb do gene *ompA* das amostras de *Chlamydia trachomatis* isoladas de raspado ocular de escolares da rede pública do Estado do Pará (PA/BR), de amostras do *Genbank* e grupo externo com cepa de *Chlamydia pneumoniae* (CP/NC002491), utilizando o método estatístico de Neighbor-joining, com modelo de correção de Kimura 2-parâmetros e teste filogenético com 2000 réplicas de *Bootstrap*.

7 DISCUSSÃO

As orientações da OMS (WHO, 2006, 2007) para os programas de controle do tracoma não contemplam os ensaios de laboratórios para determinar a presença da doença. As intervenções são baseadas em sinais clínicos do tracoma, que quando observados priorizam os indivíduos e comunidades para ações de tratamento com antibiótico ou a oferta de cirurgia, quando necessária, nos casos de entrópio e triquíase. No entanto, é de fundamental importância, para as ações de saúde pública, a confirmação laboratorial do agente etiológico do tracoma.

Este estudo confirmou a presença de *C. trachomatis* em amostras de escolares da rede pública do Estado do Pará, com sinais clínicos de tracoma. A Sensibilidade de 26,92% (14/52) da IFD neste estudo corroborou resultados encontrados na literatura (DAMASCENO, 2004; FERRAZ et al., 2010; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; MEDINA et al, 1996; 2011; SEADI et al., 2002) apesar de taxas inferiores e superiores terem sido encontradas por Thein et al. (2002), que detectaram em regiões com baixa e alta prevalência de tracoma positividade pela IFD de 8% e 70%, respectivamente.

Com relação ao gênero não se observou diferença de prevalência, confirmando os resultados de Bamani et al. (2010) e contradizendo os resultados de King et al. (2010). As crianças mais acometidas foram as da faixa-etária de 9 a 10 anos, reforçando dados da literatura que apontam as crianças em idade pré-escolar e escolar como os grupos mais vulneráveis à infecção e os principais reservatórios das formas ativas da doença (BAMANI et al., 2010; CHINEM et al., 2006; KING et al., 2010; KOIZUMI et al., 2005; MACHADO et al., 2009).

O critério para positividade da IFD, definido pela presença de cinco ou mais CE em lâmina contendo pelo menos 80 células colunares, confirmou a circulação da *C. trachomatis* nas comunidades estudadas e estabeleceu a existência de focos endêmicos, porém, não demonstrou sensibilidade suficiente para a confirmação de todos os casos clínicos.

Não houve diferença significativa nos resultados da IFD entre as amostras do grupo que apresentou 100 células ou mais por lâminas daquelas contendo menos de

100 células, discordando de estudo anterior que obteve sensibilidade maior em lâminas contendo 100 ou mais células (MEDINA et al, 1996) e critério de positividade igual ao presente estudo.

Foi visualizado ao menos um CE em 27 Lâminas de IFD das 38 amostras que apresentaram resultados negativos. Caso o critério de positividade tivesse sido baseado na presença de um ou mais CE, ao invés de cinco ou mais, a sensibilidade do teste nessas lâminas poderia ser de quase 80%. O desempenho do método de IFD demonstrou ser altamente dependente do número de CE visualizados nas lâminas analisadas, e não apenas da presença deles, concordando com os estudos de Medina et al. (1996) e Sachdeva et al. (2009). O erro de diagnóstico na IFD foi minimizado, haja vista as amostras terem sido examinadas e submetidas ao controle de qualidade por dois técnicos experientes em diferentes momentos com concordância para os dois examinadores.

A dicotomia entre a presença da infecção e achados clínicos deve ser considerada quando do uso da grade de classificação simplificada do tracoma adotada pela OMS, onde para o diagnóstico clínico de TF é necessário a presença de no mínimo cinco folículos na conjuntiva tarsal superior (HU et al., 2010). Neste estudo, todos os escolares clinicamente positivos apresentavam no momento da coleta a forma clínica TF. O tracoma intenso (TI) com infiltração e espessamento difuso da conjuntiva, outra forma ativa da doença, associado a maior produção cicatricial quando comparado à forma folicular, não foi encontrado, inferindo que a carga bacteriana estava baixa bem como a prevalência nos municípios estudados.

A metodologia molecular utilizada (*Nested-PCR*) foi concebida para amplificar um fragmento do gene *omp1* e, demonstrou uma positividade de 49% (24/49). Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios quando comparado ao estudo realizado por Barbeyrac et al. (2007) que relatou taxa de positividade da PCR para o tracoma ativo oscilando de 8% a 80% .

Vários fatores devem ser considerados ao se analisar os resultados negativos dos exames laboratoriais, em crianças com sinais clínicos de tracoma, como a conservação e transporte da amostra, a dificuldade da coleta em crianças, a diversidade dos sorotipos existentes, além do estagiamento e gravidade da doença

que, quando apresenta baixa carga bacteriana reduz a sensibilidade dos testes laboratoriais, aumentando a ocorrência desses resultados (LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; MEDINA et al., 1996).

Embora os testes de amplificação de ácido nucleico sejam os mais sensíveis para detecção de *C. trachomatis*, principalmente em amostras de pacientes com tracoma, algumas publicações apontam como limitações desses testes, a baixa celularidade, a presença de inibidores da *Taq* DNA polimerase e falhas no processamento das amostras (HU et al., 2010; LIMA et al., 2007). Todos esses indicadores de qualidade foram analisados neste estudo.

A celularidade não interferiu nos resultados da IFD, mas a maior quantidade de células, assim como a presença de CE, tiveram relação com os resultados positivos da *Nested-PCR*. A qualidade do DNA extraído, avaliada pela pesquisa da β -globina humana, apresentou inibidores da *Taq* DNA polimerase em três amostras, uma das quais foi positiva pela IFD com sete CE. A quantidade de proteínas e de DNA presentes nas amostras não interferiu na sensibilidade da *Nested-PCR*.

O resultado negativo da *nested-PCR* para o gene *ompA* da *C. trachomatis* em amostras contendo de um a sete CE pode ter sido ocasionado por perda de DNA no momento da extração. A baixa taxa de detecção observada na *Nested-PCR* para o gene *ompA* pode também ter ocorrido em função da diversidade de oligonucleotídeos utilizados na amplificação de diferentes fragmentos de gene do DNA em graus variados.

O gene *ompA* é adequado para identificar, por PCR em tempo real, a infecção e a genotipagem de *C. trachomatis* por ter regiões conservadas, ideais para a fixação de oligonucleotídeos e domínios variáveis apropriados para o sequenciamento genético, permitindo a identificação de todos os 19 sorotipos da bactéria (JALAL et al., 2007; LIMA et al., 2007). A metodologia de PCR em tempo real para genotipagem de *C. trachomatis*, desenvolvida por Jalal et al. (2007), obteve uma sensibilidade de 80% e 90% em amostras de *swab* genital e retal, respectivamente. A especificidade foi de 100% para cepas de *C. trachomatis* com 95% de probabilidade de detecção com quatro cópias do genoma e intervalo de confiança de três a seis cópias.

Por outro lado, as reações de PCR utilizando DNA do plasmídeo críptico como alvo são consideradas mais adequadas para o diagnóstico laboratorial da *C. trachomatis* por apresentar de sete a 10 cópias de DNA por organismo, enquanto o gene *ompA* possui apenas uma única cópia por organismo (SACHDEVA et al., 2009), assim, a taxa de detecção de *C. trachomatis* utilizando a PCR em tempo real ou os oligonucleotídeos direcionados ao gene do plasmídeo críptico poderia ter sido superior ao obtido com o uso da Nested-PCR para o gene *ompA*.

A Nested-PCR identificou *C. trachomatis* em amostras que não apresentaram CE pela IFD. Provavelmente este fato ocorreu por conta da precocidade da infecção, encontrando-se o agente bacteriano na fase não infecciosa da doença cujo estágio do ciclo vital apresenta as formas reticuladas intracelular da *Chlamydia*.

A reprodutibilidade da técnica não foi satisfatória para amostras contendo baixas cargas de *Chlamydia*, sendo a presença de CE um fator determinante. Outros estudos relataram a mesma associação ao correlacionar a cinética da doença com uma fase de latência onde a infecção está presente sem sinais clínicos, uma fase latente da doença onde se observa manifestação da doença com presença de sinais clínicos e a fase de recuperação onde ocorre a cura da infecção, mas os sinais clínicos persistem (HU et al., 2010). Na fase de recuperação o diagnóstico clínico pode ser positivo para o tracoma ativo, porém nos testes de amplificação de ácido nucleico, provavelmente será negativo, pela ausência de DNA bacteriano.

Os resultados negativos das PCR também podem ter ocorrido em função de infecções causadas por outros organismos que não *C. trachomatis* como Adenovírus, *Herpes simplex*, o vírus *Epstein Barr*, *molusco contagioso*, *Moraxella* spp ou, por outras espécies *Chlamydiaceae* como a *C. pneumoniae* e *C. psittaci* que já foram relatadas associadas a infecções mistas no tracoma (DEAN et al., 2008; NGONDI et al., 2009).

Os sinais de tracoma ativo nem sempre se correlacionam com a presença de *C. trachomatis*. Barbeyrac et al. (2007), observaram que nem sempre é possível a detecção de *C. trachomatis* em indivíduos com sinal clínico de tracoma ativo. Em contrapartida, foi detectado *C. trachomatis* nas amostras de raspado ocular em indivíduos que não apresentavam sinais característicos de tracoma nem preenchi-

os critérios clínicos da doença ativa, em regiões endêmicas. Este dado pode ser justificado pelo estagiamento da infecção e o *status* da inflamação.

A genotipagem de *C. trachomatis* representa uma importante contribuição à saúde pública principalmente para o desenvolvimento de vacinas e esclarecimento entre associação dos genótipos com as manifestações clínicas. O conhecimento da distribuição geográfica permite priorizar políticas públicas em áreas endêmicas facilitando tratar e acompanhar os sintomáticos e comunicantes.

Estudos de genotipagem da *C. trachomatis* em amostras oculares presentes no Brasil são necessários para uma melhor avaliação quanto a diversidade das estirpes desta bactéria circulantes no País, associadas ao tracoma. As análises das sequências nucleotídicas do gene *ompA* de sete amostras resultaram na identificação de duas cepas do genótipo L1 de *C. trachomatis*, caracterizado como um dos agentes etiológicos do linfogranuloma venéreo (LGV).

Quando comparadas com as sequências dos genótipos de referência da *C. trachomatis* biovars LGV recuperados do Genbank, as sequências dos genótipos L1/440 e L1/DQ064294 (BRUNELLE; SENSABAUGH, 2006), L1/M36533 (PICKETT; WARD; CLARKE, 1987) e L1/DQ460732 (dados não publicado), foram as que apresentaram maior similaridade com todos os isolados do presente estudo. A menor homologia encontrada para o genótipo L1 da *C. trachomatis* foi com a cepa BH/BR-FJ428245 (RIBEIRO et al., 2006).

Ribeiro et al. (2006), em estudo de genotipagem com *C. trachomatis* em amostras da endocérvice de mulheres atendidas em um Serviço Público de Belo Horizonte (Minas Gerais), identificaram 13 variantes genéticas do gene *ompA*, características dos genótipos D, E, F, K e L1, sendo o primeiro estudo a identificar os genótipos da *C. trachomatis* no Brasil.

Pickett, Ward e Clarke (1987), a partir de cultivo de células *McCoy* tratadas com Cicloheximida, determinaram a sequência nucleotídica completa para o gene da proteína da membrana externa principal da *C. trachomatis* genótipo L1, revelando diferença de seis nucleotídeos na região homóloga da sequência espécie-específica e em quatro sequências de aminoácidos na região N-terminal.

Os genótipos de *C. trachomatis* responsáveis pelo tracoma são A, B, Ba e C, no entanto, cepas urogenitais dos genótipos D, E, G, F e J já foram isoladas de populações com tracoma na Ásia, África e Dinamarca, o que comprova a associação dos genótipos sexualmente transmissíveis na patogenia da doença em regiões endêmicas de tracoma (DEAN et al., 2008).

Em outro estudo, Brunham et al. (1990) isolou os sorotipos A, B, Ba, D, E, F e L2 em crianças com sinais clínicos de tracoma em uma área central do Kenya (África). As mães das crianças foram investigadas para infecções genitais e quatro apresentaram infecção com sorovares concordantes com as crianças com tracoma pelo sorotipo D e E.

O Biovar linfogranuloma venéreo (LGV) é composto por cinco sorotipos L1, L2, L2A, L2B e L3 que infectam principalmente o tecido linfático. O LGV é uma doença sexualmente transmissível que possui caráter endêmico na África, Ásia, Caribe e América do Sul. Surtos de LGV tem ocorrido em Países da Europa como na Holanda, América do Norte e Austrália, acometendo principalmente homens que fazem sexo com homens (HALSE et al., 2006; HERNANI; NADAL., 2007).

A impossibilidade de sequenciar todas as amostras positivas na PCR para *C. trachomatis*, provavelmente deveu-se à pequena quantidade de matéria-prima combinada a algum grau de degradação das amostras tornando-as incapazes de gerar DNA de qualidade para servir como sequências alvos.

A partir de 2003 muitos estudos de base populacional estabeleceram a prevalência do tracoma nos estados brasileiros baseado em diagnóstico clínico e confirmação laboratorial pela IFD (CHINEM et al., 2006; DAMASCENO et al., 2009; FERRAZ et al., 2010; KOIZUMI et al., 2005; LUCENA; CRUZ; CAVALCANTI, 2004; MEDINA et al., 2011; SCHELLINI et al., 2010). No entanto, não existem informações no Brasil de genotipagem da *C. trachomatis* associada ao tracoma. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a rara associação do biovar LGV envolvidos na infecção ocular no Estado do Pará, porém, por se tratar de um estudo pioneiro, novos estudos devem ser conduzidos para melhor caracterizar as amostras provenientes de pessoas com tracoma.

8 CONCLUSÃO

Pelo nosso conhecimento este é o primeiro estudo a caracterizar isolados de *C. trachomatis* em amostras oculares de escolares clinicamente positivos para tracoma no Brasil, e, validar protocolo de obtenção de DNA a partir de lâminas de IFD crio conservadas.

Este estudo confirmou a infecção ocular por *Chlamydia trachomatis* em amostras de escolares com sinais clínicos de tracoma.

A identificação laboratorial de *C. trachomatis* em amostras clinicamente suspeitas de tracoma demonstrou discordância entre os resultados de PCR e IFD, com sensibilidade significativamente maior para a metodologia molecular.

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciaram a associação do biovar LGV (L1) envolvido na infecção ocular por *C. trachomatis* no Estado do Pará.

Para um futuro próximo fica a sugestão de estudos para Investigar a relação dos genótipos da C.T. com os sinais e sintomas clínicos do tracoma e Identificar os sorotipos mais prevalentes e suas consequências clínicas nos municípios paraenses prioritários para o tracoma

Propomos a utilização da metodologia utilizada neste estudo para o programa de controle do tracoma no Pará e a implantação da metodologia utilizada neste estudo no LACEN e no Laboratório de Doenças Sexualmente Transmissível e tracoma da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; BOBO, L. D.; HSIEH, Y. H.; BERKA, N.; DUNSTON, G.; BONNEY, G. E.; APREY, V.; QUINN, T. C.; WEST, S. K. Human leukocyte antigen (HLA)-B, DRB1, and DQB1 allotypes associated with disease and protection of trachoma endemic villagers. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 50, n. 4, p.734 - 8, 2009.
- ANDREASEN, A. A.; BURTON, M. J.; HOLLAND, M. J.; POLEY, S.; FAAL, N.; MABEY, D. C. W.; BAILEY, R. L. Chlamydia trachomatis ompA Variants in Trachoma: What Do They Tell ?. **Plos Negl Trop Dis** . v. 2, n. 9, p. e306, 2008. Disponível em: < w ww.plosntds.org > acesso em: 22/03/2010.
- AYRES, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. L. **Bio Estat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Data Memory produção fotográfica, 2010.
- BAMANI, S.; DEMBELE, M.; SANKARA, D.; COULIBALY, F.; KAMISSOKO, Y. ; TING, J.; ROTONDO, L. A.; EMERSON, P. M.; KING, J. D. Evaluation of the prevalence of trachoma 12 years after baseline surveys in Kidal Region, Mali. **Trop Med Int Health.** v. 15, n. 3, p. 306 - 311, 2010.
- BARBEYRAC, B.; GOLDSCHMIDT, P.; MALEMBIC, S.; RAHERISON, S.; CLERC, M.; BODAGHI, B.; BÈBÈARC.; CHAUMEIL, C. Quality assessment of conjunctival specimens for detection of Chlamydia trachomatis by PCR in children with active trachoma. **Clin Microbiol Infect.** v. 13, n. 7, p.689 - 694, 2007.
- BELLAND, R. J.; ZHONG, G.; CRANE, D. D.; HOGAN, D.; STURDEVANT, D.; SHARMA, J.; BEATTY, W. L.; CALDWELL, H. D. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 100, n. 14, 2003. Disponível em: < www. pnas. org_ cgi_ doi_ 10.1073 _pnas. 1331135100 > Acesso em:11/07/10.
- BELDA, J. W.; SHIRATSU, R.; PINTO, V. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **An Bras Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 151 -159, 2009. Disponível em: < www.scielo.br/scielo > acesso em: 22/ 02/2012.
- BENAVIDES, J. L. I.; RODRÍGUEZ, D. S.; MENCHACA, R. T.; GONZÁLEZ, G. G.; GONZÁLEZ, E. G.; TRISTÁN, E. R. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*: prevalencia y relación con los datos clínicos de vaginitis. **Medicina Universitaria.** v.9, n.35, p.53 - 57, 2007.
- BENZAKEN, A. S.; SALES, D. N.; PALHETA JUNIOR, J. I. L.; PEDROSA, V. L.; GARCIA, E. G. Prevalência de infecção por clamídia e Gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazona. **DST- J Brás Sex Transm.** v. 22, n. 3, p.129 -134, 2010.
- BEZERRA, H. L.; SANTOS, G .I. V. Tracoma em pacientes com conjuntivite alérgica. **Arq Bras Oftalmol.** v. 73, n. 3, p. 235 - 9, 2010.

BLACK, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clin Microbio Rev.** v.10, p.160 -184, 1997.

BOBO, L.; NOVAK, N.; MKOCHA, H.; VITALE, S.; WEST, S.; QUINN, T. C. Evidence for a predominant proinflammatory conjunctival cytokine response in individuals with trachoma. **Infection and Immunity.** v. 64, n. 8, p. 3273 - 3279, 1996.

BRASIL - Ministério da Saúde, **Caderno de atenção básica.** Secretaria de vigilância em Saúde. Brasília: MS, 2008. Ed.2, p. 120 - 129. Disponível em : < <http://bvsmms-bases.saude.bvs.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/ms/> > Acesso em:12 /03/ 2011.

_____. Ministério da Saúde, **Manual de Inquérito Epidemiológico Nacional do Tracoma** - Brasília: MS, 2004. Disponível em :< <http://bvsmms-bases.saude.bvs.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/ms/> >. Acesso em: 12 /03/ 2011.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle do tracoma** - Brasília: FUNASA 2001. Disponível em :< <http://bvsmms-bases.saude.bvs.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/ms/> >. Acesso em: 12 /03/ 2011.

_____. **Guia de vigilância epidemiológica do tracoma** Ministério da saúde/ SVS/ DVE - Brasília: MS, 2005, Ed.6. Disponível em : < <http://bvsmms-bases.saude.bvs.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/ms/>>. Acesso em: 12 /03/ 2011.

_____.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Pesquisa de conhecimento, atitudes e práticas na população brasileira de 15 a 54 anos**, 2004. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. Disponível em :< <http://bvsmms-bases.saude.bvs.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/ms/> >. Acesso em: 12 /03 /2011.

BRUNHAM, R. C.; LAGA, M.; SIMONSEN, J. N.; CAMERON, D. W.; PEELING, R.; McDOWELL, J.; PAMBA, H.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; MAITHA, G.; PLUMMER, F. A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* Infection among mother of children with trachoma. **Am J Epidemiol.** v. 132, n. 5, p. 946 - 952, 1990.

BRUNELLE, B. W.; SENSABAUGH, G.F. The ompA gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. **Journal Infect Immun.** v. 74, p. 578 - 585, 2006.

BURTON, M. J. Trachoma: an overview. **Br Med Bull.** v. 84, p. 99 - 116, 2007.

BURTON, M. J.; MABEY, D. C.W. The Global Burden of Trachoma: A Review. **Plos Negl Trop Dis.** v. 3, n.10, p.1 - 7, 2009.

BUSH, R. M.; EVERETT, D. E. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. **Ann N Y Acad Sci.** v. 51, p.203 - 220, 2001.

CAJAS-MONSON, L.C.; MKOCHA, H.; MUNÕZ, B.; QUINN, T. C. ; GAYDOS, C. A.; WEST, S. K. Risk Factors for Ocular Infection with *Chlamydia trachomatis* in Children 6 Months following Mass Treatment in Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis** .v.

5, n. 3, p. e 978, 2011. Disponível em: < www.plosntds.org > acesso em: 12/ 02/ 2012.

CARLSON, J. H. ; WHITMIRE, W. M.; WICKE, D. D. C. L. ; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; KUPKO III, J. J., PORCELLA, S. F.; MARTINEZ-ORENGO, N.; HEINZEN, R. A.; KARI, L.; CALDWELL, H. D. The *Chlamydia trachomatis* Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor. **infect immun.** v. 76, n. 6, p. 2273 - 2283, 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Sexually Transmitted Disease surveillance.** Department of Health and Human Services, Atlanta, GA: US, 2002. Disponível em: < www.misau.gov.mz/pt/links__1/centers_for_disease_control_and_prevention_cdc_atlanta > acesso em:11/04/2012.

CHINEN, N. H.; PENTEADO, S. A. F.; ARMOND, J. D. E.; DUARTE N.A.; CÁRMEN, M.; D'AMARAL, R. K. K.; ROSA, S. j.; MORIMOTO, W. T. M.; MEDINA, N. H. Aspectos epidemiológicos e operacionais da vigilância e controle do tracoma em escola no Município de São Paulo, Brasil. **Epidemiol e Serv de Saúde.** v.15, n. 2, p. 69 - 75, 2006.

CLARKE, I. N. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1230, n. 2011, p. E11 - E18, 2011.

COLLINGRO, A.; TISCHLER, P.; WEINMAIER, T.; PENZ, T.; HEINZ, E.; BRUNHAM, R. C.; READ, T. D.; SACHSE, K.; KATHANE, S.; FRIEDMAN, M. G.; RATTEI, T.; MYERS, G. S. A.; HORN, M. Unity in variety-The Pan-Genome of the Chlamydiae. **Mol Biol Evol.** v. 28, n. 12, p. 3253 - 3270, 2011.

DAMASCENO, R. W. F.; SANTOS, R. R.; CAVALCANTI, T. R. T.; HIDA, R. Y.; SANTOS, M. J.; SANTOS, A. M. C.; DANTAS, P. E. C. Tracoma: estudo epidemiológico de escolares em Alagoas - Brasil. **Arq Bras oftalmol.** v. 72, n. 3, p. 355 - 359, 2009.

DAROUGAR, S.; JONES, B. R. Tracoma. **Br Med Bull.** v. 39, p. 117-22, 1983.

DEAN, D.; KANDEL, R. P.; ADHIKARI, H. K.; HESSEL, T. Multiple Chlamydiae species in Trachoma: Implications for Disease Pathogenesis and Control. **PLoS Med.** v. 5, n. 14, p.57 - 69, 2008. Disponível em: < www.plosmedicine.org > acesso em: 05/02/2011.

EMERSON, P. M.; BURTON, M.; SOLOMON, A. W.; BAILEY, R.; MABEY, D. The SAFE strategy for trachoma control: using operational research for policy, planning and implementation. **Bull World Health Organ.** v. 84, n. 8, p. 613 - 619, 2006.

EVERETT, K.; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A. A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of ParaChlamydiaeaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. Nov. each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaeaceae, including a new genus and five new species, and standards of the identification of organisms. **Int J Syst Bacteriol.** v. 49, p. 415 - 440, 1999.

- FERNANDES, A. M. S.; DAHER, G.; NUZZI, R. X. P.; PETTA, C. A. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 31, n. 5, p. 235 - 40, 2009.
- FERRAZ, L. C. B.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R.; MEDINA, N. H.; DALBEN, I. Tracoma em crianças do ensino fundamental no município de Bauru - Estado de São Paulo, Brasil. **Arq Bras Oftalmol** . v. 73, n. 5, p. 433 - 7, 2010.
- FREITAS, C. A. Prevalência de tracoma no Brasil. **Rev Bras Malariol doenças Tropicais.** v. 19, p. 185 - 218, 1967.
- _____. Prevalência de tracoma no Brasil. **Rev Bras Malariol doenças Tropicais.** Brasília, XXVIII, (1/4) p. 227- 370, 1976
- _____. Bolsões hiperendêmicos de tracoma – situação atual. **Rev Bras Malariol doenças Tropicais.** Brasília, XXIX, p. 33 - 68, 1977.
- FURLANETO, I. P.; SOUSA, E. B.; BRITO, M. L.; LIMA, G. E. F.; LOPES, M. L.; SILVA, S. M.; LIMA, K. V. B. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de ziehl-neelsen. **Cad Saúde colet.** v. 15, n. 3, p. 401 - 414, 2007.
- GIRALDO, P. C.; SIMÕES, J. A. Clamídia e micoplasmas. In: Halbe H. W. **Tratado de ginecologia.** 3. ed. São Paulo: Roca; 2000. p.1047 - 58.
- GONÇALVES, A. K. S.; SILVA, M. J. P.; MAISONNETTE, A.; ANDRADE, C. F.; PONTES, A. C.; DANTAS, G. I. L.; JUNIOR, J. E.; GIRALDO, P.C. Rastreamento universal para cervicite *Chlamydia* na: uma revisão sistemática. **Femina.** v. 37, n.10, 2009.
- GREER, C. E.; LUND, J. K.; MANOS, M. M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for Long-term Storage and prospective Studies. **PCR Methods Appl.** v.1, p. 46 - 50, 1991.
- HALSE, T. A. ; MUSSER, K. A.; LIMBERGER, R. J. A multiplexed real-time PCR assay for rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and identification of serovar L-2, the major cause of Lymphogranuloma venereum in New York. **Journal Mol Cell Probes.** v. 20, n. 5, p.290 - 297, 2006.
- HERNANI, B. L.; NADAL, S.R. Linfogranuloma Venéreo - Aumento na Incidência Sugere Surto Mundial da Doença. **Rev bras Coloproct.** v. 27, n. 2, p. 224 - 227, 2007.
- HESSEL, T.; DHITAS, P. L.; PLANK, R.; DEAN, D. Immune Response to *Chlamydia* 60-kilodalton heat shock protein in tear from Nepal trachoma patients. **Infect Immun.** v. 69, n. 8, p. 4996 - 5000, 2001.
- HORN, M.; COLLINGRO, A.; SCHMITZ-ESSER, S.; BEIER, C.; PURKHOLD, U.; FARTMANN, B.; BRANDT, P.; NYAKATURA, G. J.; DROEGE, M.; FRISHMAN, D. j.;

RATTEL, T.; HANS-WERNER, M.; WAGNER, M. Illuminating the evolutionary history of Chlamydiae. **Science**. v. 304, p. 728, 2004.

HU, V. H.; HARDING-ESCH, E. M.; BURTON, M. J.; BAILEY, R. L.; KADIMPEUL, J.; MABEY, D. C. W. Epidemiology and control of trachoma: systematic review. **Trop Med Int Health**. v.15, n.6, p. 673 - 691, 2010.

HUGUET, P.; BELLA, L.; EINTERZ, E.; GOLDSCHMIDT, P.; BENSAID, P. Trachoma mass treatment with azithromycin 1.5% eye drops in Cameroon: feasibility, tolerance and effectiveness. **Br J Ophthalmol**. v. 94, n. 2, p. 157 - 160, 2010.

JALAL, H.; STEPHEN, H.; ALEXANDER, S.; CARNE, C.; SONNEX, C. Development of Real-Time PCR Assays for Genotyping of *Chlamydia trachomatis*. **J Clin Microbiol**. v. 45, n. 8, p. 2649 - 2653, 2007.

JALIL, E. M.; PINTO, V. M.; BENZAKEN, A. S.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, E. C.; GARCIA, E. G.; MOHERDAUI, F.; BARBOSA, M. J. Prevalence of *Chlamydia* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in pregnant women in six Brazilian cities. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 30, n. 12, p. 614 - 9, 2008.

JONES, B. R. The Channing concepts of trachoma and its control. **Trans Ophthalm Soc UK**. v.100, p. 25 - 29,1980.

_____.The Chlamydial diseases in: Principles and practice of infections diseases. **Churchill Livinstone**. v.1, p. 1676 -1693, 1995.

_____.The prevention of blindness from trachoma.**Trans Ophthalm Soc UK**. v. 95, p.16 -33, 1975.

JORGENSEN, I.; VALDIVIA, R. H. Pmp-Like Proteins Pls1 and Pls2 Are Secreted into the Lumen of the *Chlamydia trachomatis* Inclusion. **Infect Immun**. v. 76, n. 9, p. 3940 - 3950, 2008.

KARI, L.; WHITMIRE, W. M.; CRANE, D. D.; REVENEAU, N.; CARLSON, J. H.; GOHEEN, M. M.; PETERSON, E. M.; PAL, S.; LA MAZA, L. M.; CALDWELL, H. D. *Chlamydia trachomatis* Native Major Outer Membrane Protein Induces Partial Protection in Non-Human Primates: Implication for a Trachoma Transmission Blocking Vaccine. **J Immunol**. v.182, n.12, p.8063 – 8070, 2009.

KESE, D.; POTOČNIK, M.; MATIČIĆ, M.; KOGOJ, R. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* directly from urogenital and conjunctiva samples using an ompA gene pyrosequencing-based assay. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 63, p. 210 - 216, 2011.

KLINT, M.; THOLLESON, M.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; BIRKELUND, S.; NILSSON, A.; HERRMANN, B. Mosaic structure of intragenic repetitive elements in histone H1-like protein Hc2 varies within serovars of *Chlamydia trachomatis*. **BMC Microbiol**. v. 10, n. 81, 2010. Disponível em:< www.biomedcentral.com > acesso em: 27/01/2011.

- KING, J. D.; JIP, N.; JUGU, Y. S. OTHMAN, A.; RODGERS, A.F.;DAJOMD.Y.; MIRI, E.; EMERSON, P.M. Mapping trachoma in Nasarawa and Plateau States, central Nigeria. **Br J Ophthalmol** . v. 94, p. 14 -19, 2010.
- KOIZUMI, I. K.; MEDINA, N. H.; D'AMARAL, R. K. K.; MORIMOTO, W. T. M.; CALIGARIS, L. S. A.; CHINEN, N.; ANDRADE, Y. M. R.; CARDOSO, M. R. A. Prevalência do tracoma em escolares e pré-escolares no Município de São Paulo. **Rev Saúde Pública**. v. 39, n. 6, 2005.
- LI, Z.; CHEN, D.; ZHONG, Y.; WANG, S.; ZHONG, G. The Chlamydial Plasmid-Encoded Protein pgp3 Is Secreted into the Cytosol of Chlamydia-Infected Cells. **Infect Immun**. v. 76, n. 8, p. 3415 - 3428, 2008.
- LIMA, H. E.; OLIVEIRA, M. B.; VALENTE, B. G.; AFONSO, D.A.; DAROCHA, W. D.; SOUZA, M. C.; ALVIM, T. C.; BARBOSA-STANCILOLO, E. F.; NORONHA, F. S. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens in Brasil. **Sex Transm Dis**. v. 34, n. 9, p. 709 -717, 2007.
- LOOMIS, P. W.; STARNBACK, N. M. T. cell responses to *Chamydia trachomatis*. **Currente Opinion in Microbiology**. v. 5, p. 87 - 91, 2002.
- LUCENA, A. R.; CRUZ, A. A. V.; CAVALCANTI, R. Estudo epidemiológico do tracoma em comunidade da Chapada do Araripe – Pernambuco – Brasil. **Arq Bras Oftalmol**. v. 67, p.197- 200, 2004.
- MACHADO, M. O.; FRAGA, D. S.; FLORIANO, J. F.; MENEZES, M. E.; TRAEBERT, J. Prevalência de infecção por Chlamydia tracomatis em amostras oculares de pacientes com conjuntivite em laboratório de genética e biologia molecular na região metropolitana de Florianópolis. **Rev Bra Oftalmol**. v. 68, n. 4, p. 206 - 211, 2009.
- MARIOTTI, S. P.; PASCOLINI, D.; ROSE-NUSSBAUMER, J. Trachoma: Global magnitude of a preventable cause of blindness. **Br J ophthalmol**. v. 93, p. 563 - 568, 2009.
- MARQUES, C. A. S.; MENEZES, M. L. B. Infecção Genital por Chlamydia trachomatis e Esterilidade. **DST – J bras Doenças Sex. Transm**. v. 17, p. 66 - 70, 2005.
- MARQUES, C. A. S.; MENEZES, M. L. B.; COELHO, I. M. G.; MARQUES, C. R. C.; CELESTINO, L. C.; MELO, M. C.; LIMA, P. R. Infecção genital por chlamydia trachomatis em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **DST – J bras Doenças Sex Transm**. v. 19, n. 1, p. 5 -10, 2007.
- MICHELON, J.; BOENO, A.; CUNHA FILHO, E. V.; STEIBEL, G.; BERG, C.; TORRENS, M.C. T. Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**. v. 15, n. 2, p. 97 - 102, 2005.
- MEDINA, N. H.; GENTIL, R. M.; CARAÇA, M.; SUZUKI, C. K.; MELLES, H. H. B. Análise de exames de Imunofluorescência direta para o diagnóstico de Tracoma. **Rev saúde pública**. v. 30, n. 2, p. 135 - 40, 1996.

MEDINA, N. H.; LOPES, M. F.; DURKIN, S. R.; CARDOSO, M. R. A.; LUNA, E. A.; KOIZUMI, I. K.; BROCK, K. R.; FREITAS, H. S. A.; MAURÍCIO, M. A. Survey of Trachoma within school students in the state of Roraima, Brasil. **Ophthalmology**. v. 118, p. 477- 483, 2011.

MILLER, K. E. Diagnosis and Treatment of *Chlamydia trachomatis* Infection. **Am Fam Physician**. v. 3, n. 8, p.1411- 416, 2006. Disponível em:< www.aafp.org/afp > acesso em: 13/032011.

MIRANDA, A. E.; GADELHA, A. J.; PASSOS, M. R. L . Impacto da infecção pela *Chlamydia trachomatis* na saúde reprodutiva. DST. **Jornl Bras Doenças Sex Trans**. v. 15, n. 1, p. 53 - 58, 2003.

MPYET, C.; GOYOL, M.; OGOSH, C. Personal and environmental risk factors for active trachoma in children in Yobe state, north-eastern Nigeria. **Trop Med Int Health**. v. 15, n. 2, p. 168, 2010.

MOULDER, J. W. Looking at Chlamydiae without looking at their hosts. **American Society of Microbiology News**. v. 50, p. 353 - 362, 1984.

_____. The relation of basic biology to pathogenic in the genus *Chlamydia*. **Infection**. v. 10, p. 10 -18, 1982.

_____. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. **Microbiol Rev**. v. 55, p.143 -190, 1991.

MPYET, C.; GOYOL, M.; OGOSHI, C. Personal and environmental risk factors for active trachoma in children in Yobe state, north-eastern Nigeria. **Tropical Medicine and International Health**. v. 15, n. 2, p. 168 -172, 2010.

NATIVIDAD, A.; HULL, J.; LUON, G.; HOLLAND, M.; ROCKETT, K.; JOOF, H.; BURTON, M.; KWIATKOWSKI, D. M. D.; BAILEY, R. immunity innate ocular *Chlamydia trachomatis* Infection: contribution of IL8 and CSF2 gene variants to risk of trachomatous scarring in Gambians. **BMC Medical genetics**. v. 10, n. 138, p.1- 11, 2009. Disponível em:< <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/10/138> > acesso em: 05/02/2011.

NEWTON, S. C.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. prevalência dos agentes de cervicite: análise da literatura. **dst – j bras doenças sex transm**. v. 16, n. 4, p. 56 - 60, 2004.

NGONDI, J.; ONSARIGO, A.; MATENDE, L. A.; BABA, S.; EMERSON, M. R. P.; ZINGESER, J. The epidemiology of trachoma in Eastern Equatoria and Upper Nile States, southern Sudan. **Bull World Health Organ**. v. 83, n. 12, p. 904 - 919, 2005.

OLIVEIRA, M. L.; AMORIM, M. M. R.; SOUZA, P. R. E.; ALBUQUERQUE, L. C. B.; BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARÃES, R. L. *Chlamydia* Infection in Patients With and Without Cervical Intra-Epithelial Lesions Tested by Real-Time PCR vs. Direct Immunofluorescence. **Braz J Infect Dis**. v. 12, n .4, p. 324 - 328, 2008.

PELICIONO, M. C. F.; PELICIONO, A. C.; MEDINA, H. N.; MASSAINI, M. G. A educação em saúde na prevenção, tratamento e controle do tracoma em uma creche do município de São Paulo. **Rev bras saúde esc.** v. 2, n. 3/4, 1992.

PICKETT, M.A.; WARD, M.E.; CLARKE, I. N. Complete nucleotide sequence of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L1. **FEMS Microbiology Letters.** v. 42, p. 185 -190, 1987.

POLACK, S.; BROOKER, S.; KUPER H.; MARIOTTI, S.; MABEY, D.; FOSTER, A. Mapping the global distribution of trachoma. **Bull World Health Organ.** v. 83, n.12, p. 913 - 919, 2005.

POIARES, L. A.; SANDRINI, F.; OSÓRIO, P. S.; LARGURA, A.; SIMÃO, R. C. G. Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. **RBAC.** v. 40, n. 3, p. 229 - 232, 2008.

RAJAK, S. N.; HABTAMU, E.; WEISS, H. A.; BEDRI, A.; GEBRE, T.; GENET, A.; KHAW, P. T.; BAILEY, R. L.; MABEY, D. C. W.; GILBERT, C. E.; EMERSON, P. M.; BURTON, M. J. Epilation for trachomatous trichiasis and the risk of corneal opacification. **Ophthalmology.** v. 119, p. 84 -89, 2012.

RAJAK, S. N.; O COLLIN, J. R.; BURTON, M. J. Trachomatous trichiasis and its management in endemic countries. **Ophthalmology.** v. 57, n. 2, p. 105 -35, 2012.

RIBEIRO, M. J. A.; LEMOS, H. E. L.; OLIVEIRA, M. B.; CORREA, J. G.; NORONHA, F. S. M. GENOTYPING OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS FROM THE ENDOCERVICAL SPECIMENS IN WOMENS OF BELO HORIZONTE. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia.** Resumo ID: 2154-1.

ROCKEY, D. D.; SCIDMORE, M. A.; BANNANTINE, J. P.; BROWN, W. J. Review Proteins in the chlamydial inclusion membrane. **Microbes and Infection.** v. 4, p. 333 - 340, 2002.

RUETTGER, A.; FEIGE, J.; SLICKERS, P.R.; SCHUBERT, E.; SACHDEVA, P.; PATEL, A. L.; SACHDEV, D.; ALI, M.; MITTAL, A.; SALUJ, D. Comparison of an in-house PCR assay, direct fluorescence assay and the Roche AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* kit for detection of *C. trachomatis*. **J Med Microbiol.** v. 58, p. 867- 873, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502371> > acesso em: 26 /08/2010.

SAKA, H. A.; THOMPSON, J. W.; CHEN, Y. S.; KUMAR, Y.; DUBOIS, L. G.; MOSELEY, M. A.; VALDIVIA, R. H. Qualitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. **Mol Microbiol.** v. 85, n. 5, p.1185 -1203, 2011.

SCHACHTER, J.; STEPHENS, R. S.; TIMMS, P.; KUO, C.; BAVOIL, P. M.; BIRKELUND, S.; BOMAN, J.; CALDWELL, H.; CAMPBELL, L. A.; CHERNESKY, M.; CHRISTIANSEN, G.; CLARKE, I. N.; GAYDOS, C.; GRAYSTON, J. T.; HACKSTADT, T.; HSIA, R.; KALTENBOECK, B.; LEINONNEN, M.; OCJIUS, D.; MCCLARTY, G.; ORFILA, J.; PEELING, R.; PUOLAKKAINEN, M.; QUINN, T. C.;

RANK, R. G.; RAULSTON, J.; RIDGEWAY, G. L.; SAIKKU, P.; STAMM, W. E.; TAYLOR- ROBINSON, D.; WANG, S. P.; WYRICK, P.B. Radical changes to Chlamydial taxonomy are not necessary just yet. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 51, p. 249, 2001.

SACHDEVA, P.; LAL PATEL, A.; SACHDEV, D.; ALI, M.; MITTAL, A.; SALUJA, D. Comparison of an in-house PCR assay, direct fluorescence assay and the Roche AMPLICOR Chlamydia trachomatis kit for detection of C. trachomatis. **J Med Microbiol.** v. 58, p. 867– 873, 2009.

SCHELLINI, S. A.; LAVEZZO, M. M.; FERRAZ, L. B.; NETO, J. O.; MEDINA, N.H. Prevalência e localização espacial dos casos de tracoma detectados em escolares de Botucatu, São Paulo- Brasil . **Arq Bras Oftalmol.** v. 73, n. 4, p. 358 - 62, 2010.

SEADI, C. F.; ORAVEC, R.; POSER, B. V.; CANTARELLI, V. V.; ROSSETT, M. L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas. **J Bras. Patol Med Lab.** v. 38, p.125 - 133, 2002.

SETH-SMITH, H. M. B.; HARRIS, S. R.; PERSSON, K.; MARSH, P.; BARRON, A.; BIGNELL, A.; BJARTLING, C.; CLARK, L.; CUTCLIFFE, L. T.; LAMBDEN, P. R.; LENNARD, N.; LOCKEY, S. J.; QUAIL, M. A.; SALIM, O.; SKILTON, R. J.; WANG, Y.; HOLLAND, M. J.; PARKHILL, J.; THWHOON, N. R.; CLARKE, I. N . Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. **BMC Genomics.** v. 10, p. 1 - 10, 2009. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/239> > acesso em: 12/ 12/ 2011.

SKWOR, T. A.; ATIK, B.; KANDEL, R. P.; ADHIKARI, H. K.; SHARMA, B.; DEAN, D. Role of secreted conjunctival mucosa cytokine and chemokine proteins in different stages of trachomatous disease. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 2, n. 7, p. 26 - 28, 2008.

SRIVASTAVA, P.; GUPTA ,R. J. H. A.; ,HEM, C. J. H. A. R.; BHENGRAJ, A. R.; SALHAN, S.; MITTAL, A. Serovar-specific immune responses to peptides of variable regions of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein in serovar D- infected women. **Clin Exp Med.** v. 8, p. 207- 215, 2008.

STORZ, J.; PAGE, L. A. Taxonomy of the Chlamydiae: reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. **Int J Syst Bacteriol.** v. 21, p. 332 - 334, 1971.

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. **Emerg Infect Dis.** v. 14, n. 3, p. 445 - 453, 2008. Disponível em: < www.cdc.gov/eid > acesso em: 26/08/2010.

SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DA SAÚDE PÚBLICA (SUCAM) **Relatório técnico administrativo.** Belém, 1989.

TAYLOR, H. Trachoma: A Blinding Scourge from the Bronze Age to the Twenty-First. **Book reviews.** v. 48, p. 845, 2009.

THEIN, J.; ZHAO, P.; LIU, H.; XU, J.; J. H. A. H.; MIAO, Y.; PIZZARELLO, L.; TAPERT, L.; SCHACHTER, J.; MABON, M.; OSAKI-HOLM, S.; LIETMAN, T.; PAXTON, A. Does clinical diagnosis indicate ocular chlamydial infection in areas with a low prevalence of trachoma? **Ophthalmic Epidemiol.** v. 9, n. 4, p. 263 - 9, 2002.

THYLEFORS, B.; DAWSON, C. R.; JONES, B.R.; WES, S.K.; TAYLOR, H. R. A simple system for assessment of trachoma and its complications. **Bull World Health Organ.** n. 65, p. 477- 483, 1987.

THOMPSON, N. R.; HOLDEN, M. T. G.; CARDER, C.; LENNARD, N.; LOCKEY, S. J.; SKIPP, P. M.; O'CONNOR, P. C. D.; GOODHEAD, I.; NORBERTZCAK, H.; HARRIS, B.; ORMOND, D.; RANCE, R.; QUAIL, M. A.; PARKHILL, J.; STEPHENS, R. S.; CLARKE, I. N. *Chlamydia trachomatis*: Genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates **Genome Res.** v. 18, p.161 - 171, 2008. Disponível em: <www.genome.org> acesso em: 16 /08/ 2011.

WANG, Y.; KAHANE, S.; CUTCLIFFE, L. T.; SKILTON, R. J.; LAMB DEN, P. R.; CLARKE, N. Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: Restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of plasmid shuttle vector. **Plos Pathogens.** v. 7, n. 9, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Elimination of blinding trachoma by the year 2020.** Cairo, Apr. 2007. Disponível em:< www.who.int/entity/gho/neglected_diseases/trachoma/en/ - 22k > acesso em: 08/05/2010.

_____. **trachoma control. A guinde for programme managers.**2006. Disponível em:< www.who.int/entity/gho/neglected_diseases/trachoma/en/ - 22k > acesso em:08/10/2009.

_____. **The SAFE strategy.** Preventing trachoma. A guinde for environmental sanitation and improved hygiene. Geneva 2001. Disponível em:< www. who. int/ entity/gho/neglected_diseases/trachoma/en/ - 22k > acesso em: 30/10/2011.

_____. **Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections:** overview and estimates [document on the Internet]. Geneva: WHO; 2001 . Disponível em:< http:// www. who. int/hiv/pub/sti/who _hiv_aids_2001 .02.pdf> acesso em: 30/12/2011.

WRIGHT, H. R.; TURNER, A.; TAYLOR, H. R. Centre for Eye Research Austral Trachoma and poverty: unnecessary blindness further disadvantages the poorest people in the poorest countries. **Clin Exp Optom.** v. 90, n. 6, p. 422 - 428, 2007.

ZHANG, Y.; MACARTHUR, C.; MUBILA, L.; BAKER, S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC Medicine.** v. 8, n. 67, p. 1 - 9, 2010. Disponível em: < http://www.biomedcentral.com > acesso em: 22/02/2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A - FICHA DE INQUÉRITO DE TRACOMA / BUSCA ATIVA DE CASOS (CONTINUAÇÃO).

INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO

A ficha de INQUÉRITO/BUSCA ATIVA deve ser utilizada para preenchimento de dados nos inquéritos escolares e/ou domiciliares.

Campos de identificação

Órgão Executor: anotar o nome da instituição responsável pelo inquérito/busca ativa (Funasa ou SES da Unidade Federada ou SMS do município ou outro órgão).

Data: anotar dia, mês e ano de realização do inquérito/busca ativa.

Agravo/Doença: Tracoma = Código (CID10) A71.9.

UF: anotar a Unidade Federada à qual pertence o município/localidade de realização do inquérito/busca ativa.

Município: anotar o nome do município onde está sendo realizado o inquérito/busca ativa.

Localidade: anotar o bairro ou distrito onde está sendo realizado o inquérito/busca ativa.

Inquérito: anotar número 1 se o inquérito for escolar e número 2 se o inquérito for domiciliar.

Escola: no caso de inquérito escolar, anotar o nome completo da instituição onde está sendo realizado o inquérito.

Endereço: anotar o endereço da escola ou da residência das pessoas examinadas.

Turno: anotar o turno matutino, vespertino ou noturno.

Classe/turno: identificar a série e a turma da escola na qual está sendo realizado o inquérito.

Zona: anotar 1- Urbana; 2- Rural; 3- Periurbana; 5- Ignorado

Dados dos pacientes

Nº: anotar o número sequencial de registro das pessoas examinadas.

Nome: anotar o nome e sobrenome das pessoas examinadas.

Sexo: marcar com X se masculino ou feminino.

Idade: anotar a idade em anos para crianças de um ano completo. Em menor de 1 ano, anotar a idade em número de meses, seguido de M.

Código:

TF	Infamação tracomatosa folicular
TI	Infamação tracomatosa intensa
TS	Cicatrização conjuntival tracomatosa
TT	Triquitase tracomatosa
CO	opacificação corneana

Forma clínica:

Código	Forma clínica	Procedimento
1	TF	Anotar nº 1 quando apresentar TF em um ou ambos os olhos.
2	TI	Anotar nº 2 quando apresentar TI em um ou ambos os olhos, ou associada à TF em um ou ambos os olhos.
3	TS	Anotar nº 3 quando apresentar TS em um ou ambos os olhos.
4	TS + TF	Anotar nº 4 quando apresentar TS em um ou ambos os olhos, associada com TF em um ou ambos os olhos.
5	TS + TI	Anotar nº 5 quando apresentar TS em um ou ambos os olhos, associada com TI em um ou ambos os olhos, independente de apresentar ou não TF.
6	TT	Anotar nº 6 quando apresentar TT em um ou ambos os olhos, independente de apresentar TF e/ou TI. Toda TT é associada à TS; se não encontrar TS, a triquitase não é tracomatosa.
7	TT + CO	Anotar nº 7 quando apresentar TT em um ou ambos os olhos, associada à CO em um ou ambos os olhos. Considerar também como 7 se houver outras formas clínicas associadas à TT+CO.
8	CO	Anotar nº 8 quando apresentar CO em um ou ambos os olhos, independente de estar associada às formas TF, TI ou TS.

Outras afecções oculares: marcar com X em Conj., na presença de conjuntivites virais, bacterianas e outras; e com X em Cat., na presença de catarata senil em um ou ambos os olhos.

Acuidade visual: anotar o resultado do exame de acuidade visual encontrado para cada um dos olhos (em números decimais de 0,1 até 1): OD=olho direito e OE=olho esquerdo, de acordo com a tabela de Snellen.

Atividade realizada: marcar com X em E, se foi realizado exame para detecção do tracoma; e em T, se recebeu tratamento específico para tracoma.

Servidor responsável _____

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.



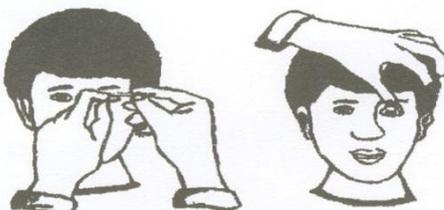
Ministério da Saúde
Fundação Nacional de Saúde
Centro Nacional de Epidemiologia
Coordenação Geral de Vigilância Epidemiológica

TRACOMA

O Tracoma é uma doença que dá nos olhos, principalmente, das crianças. Pode ser grave, quando não tratado corretamente, e pode levar à baixa de visão, em alguns casos.

O exame será feito por profissionais das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde.

A pálpebra superior da criança será evertida para ver se a conjuntiva está normal.



Será coletado exame laboratorial do olho de alguns casos que forem diagnosticados.

Todos os casos diagnosticados receberão tratamento para a doença.

Caso o Sr. (a) não concorde que a criança seja examinada ou que seja coletado exame laboratorial, favor assinar abaixo.

Assinatura do responsável:

Data: _____ Local: _____

APÊNDICE D - MATRIZ DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS.

Seq->	A/Har-1	B/Tunis-864	B/Har-36	B/TW-5	Ba/Apache-2	C/TW-3	D/UW-3	D/IC-CAL8	E/Bour	F/IC-CAL3	G/392	H/580	I/UW-12
A/Har-1	ID	0.675	0.675	0.673	0.675	0.952	0.695	0.69	0.683	0.681	0.676	0.95	0.967
B/Tunis-864	0.675	ID	0.989	0.979	0.997	0.668	0.894	0.897	0.9	0.703	0.703	0.68	0.68
B/Har-36	0.675	0.989	ID	0.989	0.987	0.668	0.897	0.9	0.897	0.698	0.698	0.68	0.68
B/TW-5	0.673	0.979	0.989	ID	0.982	0.663	0.887	0.889	0.895	0.7	0.7	0.67	0.675
Ba/Apache-2	0.675	0.997	0.987	0.982	ID	0.665	0.892	0.894	0.902	0.703	0.703	0.68	0.678
C/TW-3	0.952	0.668	0.668	0.663	0.665	ID	0.695	0.685	0.675	0.681	0.679	0.95	0.964
D/UW-3	0.695	0.894	0.897	0.887	0.892	0.695	ID	0.989	0.907	0.723	0.721	0.7	0.703
D/IC-CAL8	0.69	0.897	0.9	0.889	0.894	0.685	0.989	ID	0.909	0.721	0.713	0.69	0.698
E/Bour	0.683	0.9	0.897	0.895	0.902	0.675	0.907	0.909	ID	0.698	0.701	0.68	0.685
F/IC-CAL3	0.681	0.703	0.698	0.7	0.703	0.681	0.723	0.721	0.698	ID	0.974	0.69	0.689
G/392	0.676	0.703	0.698	0.7	0.703	0.679	0.721	0.713	0.701	0.974	ID	0.69	0.681
H/580	0.954	0.678	0.678	0.673	0.675	0.954	0.703	0.693	0.678	0.686	0.686	ID	0.969
I/UW-12	0.967	0.68	0.68	0.675	0.678	0.964	0.703	0.698	0.685	0.689	0.681	0.97	ID
Ia/870	0.962	0.68	0.68	0.675	0.678	0.964	0.698	0.693	0.685	0.691	0.684	0.96	0.994
J/UW-36	0.972	0.675	0.675	0.673	0.675	0.972	0.698	0.693	0.685	0.689	0.681	0.96	0.979
K/UW-31	0.954	0.668	0.668	0.665	0.668	0.957	0.698	0.688	0.673	0.674	0.679	0.96	0.967
L1/440	0.696	0.905	0.905	0.894	0.902	0.689	0.925	0.93	0.889	0.734	0.731	0.69	0.701
L1-DQ460732	0.696	0.905	0.905	0.894	0.902	0.689	0.925	0.93	0.889	0.734	0.731	0.69	0.701
L1-DQ064294	0.696	0.905	0.905	0.894	0.902	0.689	0.925	0.93	0.889	0.734	0.731	0.69	0.701
L1-M36533	0.696	0.905	0.905	0.894	0.902	0.689	0.925	0.93	0.889	0.734	0.731	0.69	0.701
BH/BR-FJ428245	0.691	0.9	0.9	0.889	0.897	0.684	0.92	0.925	0.884	0.729	0.726	0.69	0.696
L2/434	0.706	0.885	0.89	0.892	0.885	0.689	0.892	0.897	0.859	0.749	0.739	0.71	0.704
L3/404	0.944	0.698	0.698	0.693	0.695	0.944	0.703	0.706	0.703	0.694	0.686	0.95	0.962
PA/BR-2333	0.701	0.905	0.905	0.9	0.902	0.694	0.925	0.927	0.892	0.739	0.736	0.7	0.706
PA/BR-2342	0.701	0.905	0.905	0.9	0.902	0.694	0.925	0.927	0.892	0.739	0.736	0.7	0.706
PA/BR-2344	0.701	0.905	0.905	0.9	0.902	0.694	0.925	0.927	0.892	0.739	0.736	0.7	0.706
PA/BR-2339	0.699	0.907	0.907	0.897	0.905	0.691	0.927	0.93	0.892	0.736	0.734	0.7	0.704
PA/BR-2341	0.699	0.907	0.907	0.897	0.905	0.691	0.927	0.93	0.892	0.736	0.734	0.7	0.704
PA/BR-2348	0.699	0.907	0.907	0.897	0.905	0.691	0.927	0.93	0.892	0.736	0.734	0.7	0.704
PA/BR-2349	0.699	0.907	0.907	0.897	0.905	0.691	0.927	0.93	0.892	0.736	0.734	0.7	0.704
CP/NC002491	0.598	0.625	0.625	0.625	0.627	0.606	0.616	0.614	0.647	0.609	0.606	0.61	0.613

APÊNDICE D - MATRIZ DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS(CONTINUAÇÃO).

Seq->	la/87	J/UW-36	K/UW-31	L1/440	L1-Q460732	L1-Q231368	L1-Q064294	L1-36533	BH/BR-J428245	L2/434	L3/404
A/Har-1	0.962	0.972	0.954	0.696	0.696	0.696	0.696	0.696	0.691	0.706	0.944
B/Tunis-864	0.68	0.675	0.668	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.9	0.885	0.698
B/Har-36	0.68	0.675	0.668	0.905	0.905	0.905	0.905	0.905	0.9	0.89	0.698
B/TW-5	0.675	0.673	0.665	0.894	0.894	0.894	0.894	0.894	0.889	0.892	0.693
Ba/Apache-2	0.678	0.675	0.668	0.902	0.902	0.902	0.902	0.902	0.897	0.885	0.695
C/TW-3	0.964	0.972	0.957	0.689	0.689	0.689	0.689	0.689	0.684	0.689	0.944
D/UW-3	0.698	0.698	0.698	0.925	0.925	0.925	0.925	0.925	0.92	0.892	0.703
D/IC-CAL8	0.693	0.693	0.688	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.925	0.897	0.706
E/Bour	0.685	0.685	0.673	0.889	0.889	0.889	0.889	0.889	0.884	0.859	0.703
F/IC-CAL3	0.691	0.689	0.674	0.734	0.734	0.734	0.734	0.734	0.729	0.749	0.694
G/392	0.684	0.681	0.679	0.731	0.731	0.731	0.731	0.731	0.726	0.739	0.686
H/580	0.964	0.964	0.964	0.694	0.694	0.694	0.694	0.694	0.689	0.706	0.949
I/UW-12	0.994	0.979	0.967	0.701	0.701	0.701	0.701	0.701	0.696	0.704	0.962
la/870	ID	0.977	0.962	0.701	0.701	0.701	0.701	0.701	0.696	0.699	0.962
J/UW-36	0.977	ID	0.972	0.699	0.699	0.699	0.699	0.699	0.694	0.704	0.959
K/UW-31	0.962	0.972	ID	0.686	0.686	0.686	0.686	0.686	0.681	0.696	0.946
L1/440	0.701	0.699	0.686	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	0.994	0.938	0.719
L1-DQ460732	0.701	0.699	0.686	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	0.994	0.938	0.719
L1-DQ064294	0.701	0.699	0.686	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	0.994	0.938	0.719
L1-M36533	0.701	0.699	0.686	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	0.994	0.938	0.719
BH/BR-FJ428245	0.696	0.694	0.681	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	ID	0.933	0.714
L2/434	0.699	0.704	0.696	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.933	ID	0.716
L3/404	0.962	0.959	0.946	0.719	0.719	0.719	0.719	0.719	0.714	0.716	ID
PA/BR-2333	0.706	0.704	0.691	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.989	0.938	0.724
PA/BR-2342	0.706	0.704	0.691	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.989	0.938	0.724
PA/BR-2344	0.706	0.704	0.691	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.989	0.938	0.724
PA/BR-2339	0.704	0.701	0.689	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.992	0.935	0.721
PA/BR-2341	0.704	0.701	0.689	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.992	0.935	0.721
PA/BR-2348	0.704	0.701	0.689	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.992	0.935	0.721
PA/BR-2349	0.704	0.701	0.689	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997	0.992	0.935	0.721
CP/NC002491	0.616	0.608	0.606	0.624	0.624	0.624	0.624	0.624	0.619	0.628	0.616

APÊNDICE D - MATRIZ DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS(CONTINUAÇÃO).

Seq->	PA/BR-2333	PA/BR-2342	PA/BR-2344	PA/BR-2339	PA/BR-2341	PA/BR-2348	PA/BR-2349	CP/NC002491
A/Har-1	0.701	0.701	0.701	0.699	0.699	0.699	0.699	0.598
B/Tunis-864	0.905	0.905	0.905	0.907	0.907	0.907	0.907	0.625
B/Har-36	0.905	0.905	0.905	0.907	0.907	0.907	0.907	0.625
B/TW-5	0.9	0.9	0.9	0.897	0.897	0.897	0.897	0.625
Ba/Apache-2	0.902	0.902	0.902	0.905	0.905	0.905	0.905	0.627
C/TW-3	0.694	0.694	0.694	0.691	0.691	0.691	0.691	0.606
D/UW-3	0.925	0.925	0.925	0.927	0.927	0.927	0.927	0.616
D/IC-CAL8	0.927	0.927	0.927	0.93	0.93	0.93	0.93	0.614
E/Bour	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892	0.647
F/IC-CAL3	0.739	0.739	0.739	0.736	0.736	0.736	0.736	0.609
G/392	0.736	0.736	0.736	0.734	0.734	0.734	0.734	0.606
H/580	0.699	0.699	0.699	0.696	0.696	0.696	0.696	0.606
I/UW-12	0.706	0.706	0.706	0.704	0.704	0.704	0.704	0.613
Ia/870	0.706	0.706	0.706	0.704	0.704	0.704	0.704	0.616
J/UW-36	0.704	0.704	0.704	0.701	0.701	0.701	0.701	0.608
K/UW-31	0.691	0.691	0.691	0.689	0.689	0.689	0.689	0.606
L1/440	0.994	0.994	0.994	0.997	0.997	0.997	0.997	0.624
L1-DQ460732	0.994	0.994	0.994	0.997	0.997	0.997	0.997	0.624
L1-DQ064294	0.994	0.994	0.994	0.997	0.997	0.997	0.997	0.624
L1-M36533	0.994	0.994	0.994	0.997	0.997	0.997	0.997	0.624
BH/BR-FJ428245	0.989	0.989	0.989	0.992	0.992	0.992	0.992	0.619
L2/434	0.938	0.938	0.938	0.935	0.935	0.935	0.935	0.628
L3/404	0.724	0.724	0.724	0.721	0.721	0.721	0.721	0.616
PA/BR-2333	ID	1,000	1,000	0.997	0.997	0.997	0.997	0.629
PA/BR-2342	1,000	ID	1,000	0.997	0.997	0.997	0.997	0.629
PA/BR-2344	1,000	1,000	ID	0.997	0.997	0.997	0.997	0.629
PA/BR-2339	0.997	0.997	0.997	ID	1,000	1,000	1,000	0.627
PA/BR-2341	0.997	0.997	0.997	1,000	ID	1,000	1,000	0.627
PA/BR-2348	0.997	0.997	0.997	1,000	1,000	ID	1,000	0.627
PA/BR-2349	0.997	0.997	0.997	1,000	1,000	1,000	ID	0.627
CP/NC002491	0.629	0.629	0.629	0.627	0.627	0.627	0.627	ID

ANEXOS

ANEXO A - ESQUEMA DE GRADAÇÃO DAS FASES DE TRACOMA DESENVOLVIDO POR Thylefors et al. (1987) E ADOTADO PELA WHO.



Fig. 1- Tracoma Folicular (TF)



Fig. 2-Tracoma Inflamatório (TI)



Fig. 3 - Tracoma Cicatricial (TS)



Fig. 4-Triquíase Tracomatosa (TT)



Fig. 5-Opacificação corneana (CO)

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 05 de Abril de 2002.

Ilmo(a). Sr(a).

> *Dra Norma Helen Medina*

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa

> *Inquerito Nacional de Tracoma*

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, em reunião, apresentou o parecer, enquadrando o referido projeto na categoria *aprovado* de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/CNS/MS, Brasília, 1996.

Atenciosamente,



Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora
CEPIAL

Stuler, 10 / agosto / 2002

ANEXO C- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.

AO CEPIAL

PARECER DO RELATOR

PROJETO DE PESQUISA: "INQUÉRITO NACIONAL DE TRACOMA".

Trata-se de estudo relevante como objetivo conhecer a prevalência de tracoma em escolares da primeira a quarta série do ensino fundamental, residentes em municípios com IDH-M menor que a média nacional, visando a implementação das ações de vigilância epidemiológica do tracoma no Brasil. Serão examinadas 7.200 crianças em cada estado sorteados, por meio de amostragem por conglomerados. Os casos de tracoma serão tratados conforme orientação do Ministério da Saúde.

Os pesquisadores apresentam modelo de consentimento informado para os pais.

Considero que o presente projeto de pesquisa preenche os requisitos da resolução 196-96, recomendado portanto sua aprovação por este comitê.

SÃO PAULO, 26 DE SETEMBRO DE 2002.

ANEXO D - APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA NO CEP/NMT.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Protocolo: Nº043/2011-CEP/NMT
2. Projeto de Pesquisa: DETECÇÃO DE CHLAMIDIA TRACHOMATIS EM AMOSTRAS DE ESCOLARES DA REDE PÚBLICA DO PARÁ COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE TRACOMA POR PCR.
3. **Pesquisador Responsável:** Raimunda Marques de Carvalho.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 16/08/2011.
6. **Data do Parecer:** 06/09/2011.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 06 de outubro de 2011.

Prof. Dr. Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.
Hellen Thais Fuzii
Coordenadora do Comitê de Ética

ANEXO E- APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO CONEP.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
Projeto de Pesquisa "Identificação laboratorial de <i>Chlamydia trachomatis</i> em amostras clinicamente suspeitas de tracoma em demanda escolar"			
Área de Conhecimento Ciências Biológicas		Grupo III	Nível Diagnostico
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se enquadra		Fase -	
Unitermos Tracoma, Chlamydia trachomatis, conjuntivite de inclusão.			
Sujeitos na Pesquisa			
Nº de Sujeitos no Centro 140 sujeitos	Total Brasil 140	Nº de Sujeitos Total 140	Grupos Especiais
Placebo	Medicamentos	Wash-out	Sem Tratamento Especifico
Banco de Materiais Biológicos			
Pesquisador Responsável			
Pesquisador Responsável Raimunda Marques de Carvalho		CPF 166.683.322-34	Identidade 15553341
Área de Especialização Microbiologia		Maior Titulação Especialista	Nacionalidade Brasileira
Endereço Av. ceara, nº 786 CEP -66070-080		Bairro Canudos	Cidade Belém
Código Postal	Telefone (91) 82681280	Fax	Email Rayc.baptista@oi.com.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.			
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Data: ____/____/____	Assinatura <i>Raimunda Marques de Carvalho</i>		
Instituição Onde Será Realizado			
Nome Universidade federal do Pará		CNPJ 34621748/0001-23	Nacional/Internacional Nacional
Unidade/Orgão Núcleo de Medicina Tropical		Participação Estrangeira Não	Projeto Multicêntrico Não
Endereço Av. Generalíssimo Deodoro, 92		Bairro Umarizal	Cidade Belém
Código Postal	Telefone (91)3241-0032	Fax (91) 3241-0032	Email
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Nome: <u>JUAREZ ANTONIO SIMÕES QUARESMA</u>		Assinatura <i>Juarez Antonio Simões Quaresma</i>	
Data: ____/____/____		Assinatura <i>Luiza Cezário Martins</i> Diretora Adjunta de NMT / UFPA	
Vinculada			
Nome Laboratório Central do Estado - LACEN-PA		CNPJ 05054929000117	Nacional/Internacional Nacional
Unidade/Orgão Secretaria Estadual de Saúde Pública-SESPA		Participação Estrangeira	Projeto Multicêntrico
Endereço Rod. Augusto Montenegro, Km 10, S/N		Bairro Icoaracy	Cidade Belém
Código Postal	Telefone (91) 32024900	Fax (91) 32024925	Email Bac_teriologia@yahoo.com.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares.			
Nome: _____		Assinatura <i>Vânia Pimentel Lucas</i>	
Data: <u>23, 12, 10</u>		Assinatura <i>Vânia Pimentel Lucas</i> MÉDICA PATOLOGISTA CLÍNICA CRM/PA 5869 Vice-Diretora/LACEN-PA	

ANEXO F - TERMO DE COMPROMISSO.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS-CEP

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, Raimunda Marques de Carvalho, brasileira, farmacêutica bioquímica, residente na avenida Ceará, nº 786, bairro de Canudos, CPF 666080-070, aluna do Curso de Mestrado em Doenças Tropicais, área Patologia, matrícula Nº 2010054M0022. Declaro, para os devidos fins, que não dei entrada em outro Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, e nesse sentido, COMPROMETO-ME com a veracidade das informações prestadas no presente documento.

Assinatura: _____

Loca e data: _____

Protocolo nº: _____