

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ADRYA LÚCIA PERES BEZERRA DE MEDEIROS

**Análise Comparativa das Técnicas de Papanicolaou e da
Imunofluorescência Direta no Diagnóstico das Infecções
Cérvico-vaginais por *Chlamydia trachomatis*.**

RECIFE
2006

ADRYA LÚCIA PERES BEZERRA DE MEDEIROS

**Análise Comparativa das Técnicas de Papanicolaou e da
Imunofluorescência Direta no Diagnóstico das Infecções
Cérvico-vaginais por *Chlamydia trachomatis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, como Pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia – Área de Concentração Morfologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Jennecy Sales Cavalcante

Co-Orientadores:

Profª Drª. Elizabeth Malagueño de Santana.

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Queiroz Lima

RECIFE
2006

Medeiros, Adrya Lúcia Peres Bezerra de
Análise comparativa das técnicas de
Papanicolaou e da imunofluorescência direta no
diagnóstico das infecções cérvico-vaginais por
***Chlamydia trachomatis* / Adrya Lúcia Peres Bezerra**
de Medeiros. – Recife : O Autor, 2006.
55 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Mestrado em Patologia, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Chlamydia trachomatis* - Doenças sexualmente
transmissíveis. 2. *Chlamydia trachomatis* -
Diagnóstico laboratorial. 3. *Chlamydia trachomatis* –
Técnica de Papanicolau. I. Título.

616.97
616.9518

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-224



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

AUTOR: ADRYA LUCIA PERES BEZERRA DE MEDEIROS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA TESE: ANÁLISE COMPARATIVA DAS TÉCNICAS DE PAPANICOLAOU
E DA IMUNOFLOURESCENCIA DIRETA NO DIAGNOSTICO DAS INFECÇÕES
CÉRVICO-VAGINAIS POR CHLAMYDIA.

ORIENTADOR: Jennecy Sales Cavalcanti
CO-ORIENTADOR: Carlos Eduardo de Queiroz Lima

TESE DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA.

DATA: 27 de março de 2006

BANCA EXAMINADORA:

Profº Nicodemos Teles de Pontes Filho

Profº. Diógenes Luis da Motta

Profaª Elizabeth Malagueño de Santana

EPIGRAFE

“ Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor. Mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos”

Martin Luther king

DEDICATÓRIA

Ao meu lindo bebê, Heitor, que Deus enviou ao mundo durante este momento de realização profissional, e que de nenhuma forma provocou obstáculos, ao contrário, foi minha fonte inspiradora, luz no meu caminho, conforto nas minhas angústias e fortaleza na minha vida.

A Deus por permitir duas tão grandes realizações em um só momento: ser mãe e ser mestre.

Ao meu querido marido Sérgio, que tanto me fortaleceu.

Aos meus iluminados pais, que tanto torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre está ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido Sérgio, que sempre está me apoiando e incentivando.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram.

Aos professores Carlos Eduardo de Queiroz e Elizabeth Malagueño, por todo o conhecimento e orientação transmitidos com paciência, competência e dedicação.

Ao professor Jennecy Sales Cavalcante por toda compreensão e orientação.

Aos professores do Mestrado em Patologia, área de concentração-Morfologia, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao professor Tetsuó por toda orientação na área estatística.

Aos professores Diógenes e Nicodemos, por todo conhecimento transmitido.

Ao professor José Falcão, pela revisão estilístico-gramatical desta dissertação.

Aos funcionários do mestrado, os quais sempre contribuíram de forma importante.

Ao colega André Felipe, por toda ajuda.

A todos os colegas do mestrado, pelas experiências compartilhadas.

A Renata e Silvana, do setor de Imunologia-LIKA, por toda a ajuda fornecida com carinho.

As funcionárias do setor de coleta citológica cérvico-vaginal do CISAM-UPE, por toda atenção e competência.

A Niedja, enfermeira do ambulatório do CISAM-UPE por toda atenção.

A Mégine da biblioteca do Ageu Magalhães, por todo conhecimento transmitido.

A todos que no decorrer do curso me ajudaram de alguma forma.

RESUMO

A citologia oncótica cérvico-vaginal, além de ser útil na triagem de câncer cervical, também pode ser utilizada na detecção de características sugestivas de infecção pela *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). O objetivo deste estudo foi comparar a citologia com a técnica de imunofluorescência direta (IFD) para *Chlamydia trachomatis*, utilizando 171 esfregaços cérvico-vaginais de mulheres atendidas no setor de coleta preventiva de câncer de colo uterino, no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros-CISAM, no Recife-PE. Seis casos (3,5%) foram positivos para *C. trachomatis* pela IFD. A citologia mostrou inclusões eosinofílicas em células metaplásicas, sendo consideradas sugestivas de infecção por *C. trachomatis* em apenas um caso (0,6%), confirmado pela IFD. A citologia pode contribuir na detecção da infecção por *Chlamydia*, desde que sejam levadas em consideração coletas adequadas, com presença de células glandulares endocervicais e/ou metaplásicas, além de se considerar também o conhecimento dos critérios citológicos característicos da infecção, visto que, quando comparada a IFD, mostrou baixa sensibilidade. A IFD deve continuar sendo utilizada na detecção de casos de infecção por *Chlamydia*, com critério e, se possível, com maior abrangência em serviços públicos de saúde.

ABSTRACT

The uterine cervix cytology, besides being useful in the screen of cervical cancer, it can also be used in the detection of suggestive characteristics of infection by the *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*). The objective of this study was to compare the cytology, and, the technique of direct immunofluorescence (IFD) for *Chlamydia trachomatis*, using 171 uterine cervix smears of women assisted in the section of uterine cancer prevention, in Amaury de Medeiros Integrated Center - CISAM, in Recife. Six cases (3,5%) were positive for *C. trachomatis* by IFD. The cytology showed eosinophilic inclusions in metaplastic cells, being considered suggestive of infection for *C. trachomatis* in just one case (0,6%), confirmed by IFD. The cytology can contribute in the detection of the *Chlamydia* infection, if appropriate collecting procedure were applied, for the presence of glandular endocervical and/or metaplastic cells, besides being considered also the knowledge of the characteristic cytological criteria of this infection, because, when compared to IFD, it showed low sensibility. IFD should continue being used in the detection of cases of *Chlamydia* infection, with criterion and, if possible, with larger inclusion in public health services.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da <i>C. trachomatis</i> na célula hospedeira	8
Figura 2 - Esfregaço cérvico-vaginal. Coloração de Papanicolaou. 400X <i>C. trachomatis</i>	39
Figura 3 – IFD para <i>C. trachomatis</i>	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AB – ABORTO

ALT – ALTERAÇÕES

ATP - ADENOSINA TRIFOSFATO

CCS - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CDC – CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS

CISAM - CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE AMAURY DE MEDEIROS

C. trachomatis – *Chlamydia trachomatis*

DE – DIFICULDADE PARA ENGRAVIDAR

DIF – DIFICULDADE

DIP – DOENÇA INFLAMATÓRIA PÉLVICA

DIU – DISPOSITIVO INTRA-UTERINO

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

DST – DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL

ELISA - ENZIMAIMUNOENSAIO

END – ENDOCERVICAIS

ENGRAV – ENGRAVIDAR

E. I – ESFREGAÇO INSATISFATÓRIA

HIST – HISTÓRIA

HPV- PAPILOMA VÍRUS HUMANO

HSIL – LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU

IFD – IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

IST – INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

Kd – KILO DALTONS

LCR – REAÇÃO EM CADEIA DA LIGASE

LIKA - LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

LSIL – LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU

MET - METAPLÁSICAS

MOMP – MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN

NIC – NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

OBST – OBSTÉTRICA

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

PAS – ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

RNA – ÁCIDO RIBONUCLÉICO

RNA_m – MENSAGEIRO

RNA_t – TRANSPORTADOR

RNA_r – RIBOSSOMAL

S – SEM

SUGEST – SUGESTIVO

UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

UPE – UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos	29
Tabela 2- Distribuição das pacientes estudadas	31
Tabela 3- Microorganismos morfológicamente classificados.....	32
Tabela 4- Descrição da pacientes segundo alterações celulares.....	33
Tabela 5- Achados citológicos e sintomas clínicos das pacientes	35
Tabela 6- Achados citológicos e os microorganismos morfológicamente.....	37
Tabela 7- Achados citológicos e faixa-etária das pacientes.....	38
Tabela 8- Achados citológicos e IFD para pesquisa de antígeno.....	40
Tabela 9- Achados da IFD para <i>C. trachomatis</i> e os sintomas.....	41
Tabela 10- Imunofluorescência direta para <i>C. trachomatis</i> e a história.....	42
Tabela 11- Reação de imunofluorescência para <i>C. trachomatis</i>	43
Tabela 12- Sensibilidade e especificidade da citologia.....	43

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1. <i>Chlamydia trachomatis</i>	6
3.2. Células Suscetíveis à Infecção	7
3.3. Ciclo de Desenvolvimento	7
3.4. Prevalência da Infecção	9
3.5. Sintomas	9
3.6. Doenças Causadas	10
3.7. Diagnóstico Laboratorial	12
4 AMOSTRAS E MÉTODOS	20
4.1. Local e População de Estudo	20
4.2. Critérios de Inclusão da Amostra	20
4.3. Critérios de Exclusão da Amostra	20
4.4. Desenho do Estudo	21
4.5. Coleta	21
4.5.1. <u>Coleta de Dados</u>	21
4.5.1.1. <u>Procedimentos para a coleta de dados</u>	21
4.5.2. <u>Coleta de Amostras</u>	21

4.6. Procedimentos e Exames Laboratoriais	22
4.6.1. <u>Fixação da Amostra</u>	22
4.6.2. <u>Exames Laboratoriais</u>	22
4.6.2.1. <u>Citologia Cérvico-Vaginal</u>	22
4.6.2.2. <u>Imunofluorescência Direta</u>	23
4.7. Variáveis do Estudo	25
4.7.1. <u>Definição das Variáveis</u>	26
4.7.2. <u>Categorização das Variáveis</u>	27
4.8. Cálculo da sensibilidade e especificidade da Citologia Oncótica	29
4.9. Análise Estatística	30
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UPE

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo C – Informações Pessoais

1 INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) está caracterizada como microorganismos procarióticos, com parasitismo intracelular obrigatório em células eucarióticas. Apresenta-se morfológicamente sob forma de corpúsculo elementar, altamente infectante e corpúsculos iniciais ou reticulados com baixa capacidade infectante, sendo uma forma intracelular de caráter reprodutor. As células mais suscetíveis são as colunares endocervicais, metaplásicas escamosas, além das células parabasais do trato genital inferior (GARCIA, 1987; SHURBAJI; GUPTA; MYRES, 1988).

A *C. trachomatis* é uma bactéria pequena, Gram-negativa com um ciclo de desenvolvimento complexo e um período de latência longo (> 30 dias). O ciclo vital da *Chlamydia* dura em torno de 48 a 72 horas e se inicia com a adesão de uma partícula infectante, o corpo elementar, à superfície de uma célula. O corpo elementar entra na célula envolto em uma vesícula fagocitária derivada da membrana celular e então se reorganiza para formar o corpo reticulado, isto é, a forma replicadora. Ainda, incluso no vacúolo, o corpo reticulado sintetiza novo material e se divide. Os corpos reticulados terminam de dividir-se entre 18 e 24 horas depois da infecção e 'amadurecem' até formar novos corpos elementares. Ao final do ciclo, a vesícula rompe-se e libera os corpos elementares que vão infectar outras células (DE PALO, 1996; MAZA; PEZZLO; BARON, 2001).

A infecção urogenital por *C. trachomatis* é uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) mais freqüentes, constituindo-se na atualidade, importante problema de saúde pública, por causar grande impacto no sistema reprodutor das mulheres (SEADI *et al.*, 2002).

A *C. trachomatis* no trato genital pode causar linfogranuloma venéreo, uretrites, cervicites, salpingites, bartholinites, endometrites e outras enfermidades.

Desde os anos 80 a infecção pela *C. trachomatis* é tida como uma das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) mais freqüentes em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa mundial de novos casos de infecção pela *C. trachomatis* em adultos era de 92 milhões em 1999, sendo que 9,5 milhões ocorreriam na América Latina e Caribe (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2001 *apud* MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003). Nas estimativas do Centro de Controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, existem mais casos novos diagnosticados de infecção pela *C. trachomatis* do que qualquer outra doença transmitida sexualmente, incluindo sífilis, gonorréia, verruga genital, herpes e aids. Entre eles é estimado que 3 e 4 milhões de casos novos de *C. trachomatis* ocorram a cada ano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2002 *apud* MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003).

No Brasil, não há muitos dados que demonstrem a situação da infecção pela *C. trachomatis*. Os dados publicados na literatura científica sobre a prevalência dessa infecção são estudos isolados, em populações específicas, em serviços determinados, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio.

O número reduzido de trabalhos sobre a *Chlamydia* no Brasil se deve a vários fatores, entre eles, a falta de sintomas clínicos, que dificulta a identificação das mulheres, além da dificuldade de acesso delas aos testes laboratoriais. Nos serviços públicos, são raros os locais que oferecem sistematicamente a pesquisa desse patógeno e, nos serviços privados, normalmente só se pesquisa *Chlamydia* em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata a presença da

bactéria. Mesmo nessas situações, a pesquisa de *Chlamydia trachomatis* ainda não faz parte da rotina da maioria dos ginecologistas, urologistas ou médicos que atendem DST (MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003).

Devido ao diagnóstico clínico não ser possível, são necessários exames laboratoriais para uma específica investigação.

Atualmente existem vários métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*, entre os quais temos a cultura de células, citologia oncológica cérvico-vaginal (técnica de Papanicolaou), imunofluorescência direta, Enzimaimunoensaio (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA), Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction - PCR) ou Reação em Cadeia da Ligase (Ligase Chain Reaction - LCR).

Como objetivo, propomos-nos analisar a Imunofluorescência direta (IFD), por ser um teste diagnóstico rápido, de extrema valia e suficiente para o diagnóstico e controle epidemiológico da infecção (ALENCAR *et al.*, 1993), sendo atualmente bastante utilizado nos laboratórios. Segundo Martinez *et al.* (1991), ele apresenta sensibilidade, em torno de 92% e especificidade, 98%. Enquanto que, o método de Papanicolaou, foi inicialmente proposto por Gupta *et al.* (1979), quando observaram características morfológicas que indicavam a infecção pela *C. trachomatis*, propuseram a identificação da *C. trachomatis* nos esfregaços cervicais de rotina pela observação de fina vacuolização intracitoplasmática, com vacúolos únicos ou múltiplos, contendo inclusões eosinofílicas, freqüentemente uniformes, moldadas ou sobrepostas com bordos ondulados, e circundadas por uma área clara. Geralmente tais inclusões são vistas em células metaplásicas escamosas e/ou colunares endocervicais. Hoje é considerado um método extremamente específico, porém,

existem restrições devido a sua baixa sensibilidade, originada muitas vezes pela amostragem celular inadequada, ou seja, coleta de material em local impróprio e falta de critérios bem definidos para os observadores na análise dos preparados.

Em decorrência da dificuldade de utilizarmos técnicas de maior custo, e visto que o Sistema Único de Saúde (SUS)- Ministério da Saúde do Brasil utiliza a citologia rotineiramente, visando à prevenção do câncer de colo de útero, assim como, eventualmente, à reação de IFD, nosso trabalho propõe-se a realizar um estudo comparativo dessas técnicas com o objetivo de observar as variáveis envolvidas nos métodos diagnósticos que permitam melhorar a especificidade e sensibilidade do diagnóstico precoce desse tipo de infecção.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar análise comparativa dos métodos morfológico, citologia oncótica cérvico-vaginal e imunológico, imunofluorescência direta no diagnóstico da infecção cérvico-uterina pela *Chlamydia trachomatis* em esfregaços obtidos de pacientes atendidas em ambulatório de prevenção de câncer da rede pública.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Evidenciar através da citologia oncótica cérvico-vaginal (técnica de Papanicolaou) as amostras sugestivas de infecção por *C. trachomatis*.

2.2.2. Detectar a infecção por *C. trachomatis* em material endocervical, utilizando a técnica de imunofluorescência direta.

2.2.3. Comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Chlamydia trachomatis*

O gênero *Chlamydia* está constituído por microorganismos procarióticos que parasitam células eucarióticas (GARCIA, 1987).

Chlamydia trachomatis é uma bactéria, obrigatoriamente intracelular que só pode viver parasitando as células que ela infecta. A *Chlamydia trachomatis* mostra 15 imunotipos: A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 e L3. Os tipos A, B, Ba e C são responsáveis pelo tracoma. Os tipos L1, L2 e L3, pelo linfogranuloma venéreo e os tipos de D a K, pelas infecções genitais (CAMPOS, 1986; WARD, 1995; PÁNUCO *et al.*, 2000).

Esses microorganismos são incapazes de produzir sua própria energia, sendo inteiramente dependentes da célula hospedeira para supri-los com ATP e outros metabólitos intermediários. Por isso, as *Chlamydias* foram inicialmente classificadas como vírus, entretanto, elas possuem uma parede celular e contêm DNA, RNA e ribossomas, sendo posteriormente reclassificadas como bactérias (SILVA, 1999).

As *Chlamydias* apresentam-se sob duas formas básicas diferentes: a de corpúsculo elementar e a de corpúsculo inicial ou reticular. Os corpúsculos elementares medem cerca de 30 nm e constituem a forma de transporte extracelular, altamente infectante. A parede celular tem uma estrutura trilaminar rígida, semelhante à das bactérias Gram-negativas. Os corpúsculos iniciais têm tamanho variável, de 800 a 1.200 nm, capacidade infectante baixa, constituindo-se como forma intracelular, de caráter reprodutor (SILVA FILHO ; LONGATTO FILHO, 2000).

A parede externa das *Chlamydias* contém muitas proteínas antigênicas, incluindo uma proteína maior de membrana denominada MOMP (*major outer*

membrane protein) e proteínas de 31 e 18 kd, responsáveis pela ligação das *Chlamydias* às células eucariontes (SILVA, 1999). As proteínas antigênicas, presentes na membrana das *Chlamydias*, induzem à ativação dos mecanismos imunológicos humorais e celulares, inclusive, a produção de imunoglobulinas específicas das classes IgA, IgM e IgG, bem como cromocitocinas, interleucinas, interferons e o fator de necrose tumoral. Com ataques antigênicos repetidos ou prolongados, as interações entre antígenos clamidiais e a defesa imunológica celular do hospedeiro geram a formação de cicatrizes por *C. trachomatis* (WESTRÖM,1999 *apud* FRIAS *et al.*,2001).

3.2 Células Suscetíveis à Infecção

Sua presença foi descrita nos esfregaços cérvico-vaginais, principalmente no citoplasma das células cilíndricas e metaplásicas (GUPTA *et al.*, 1979).

No nível genital, a zona de junção escamocolunar e a endocérvice são as mais atingidas, mas também se observam colpites, uretrites e salpingites, com risco de esterilidade (BRUNHAM *et al.*, 1983).

Na infecção cérvico-vaginal, as células mais suscetíveis são as colunares endocervicais ou metaplásicas escamosas, admitindo-se, também, as parabasais do trato genital inferior (SHURBAJI *et al.*,1988).

3.3 Ciclo de Desenvolvimento

A replicação da *Chlamydia* começa com a adesão de um corpo elementar à superfície da célula hospedeira e geralmente penetra na célula por fagocitose (SHURBAJI *et al.*, 1988).

Os corpos elementares permanecem em um vacúolo rodeado por uma membrana derivada da célula hospedeira, que os protege da ação da lisozima. Os

corpos elementares não perdem sua individualidade, aumentando de tamanho para formar o corpúsculo inicial, que é metabolicamente ativo, com intensa produção de RNA. O RNAm é produzido no DNA cromossômico usando uma polimerase de RNA que depende do DNA contido no corpúsculo elementar. O RNAt e o RNAr também estão presentes no corpúsculo elementar. Este processo consome cerca de 7 a 10 horas. O fagossoma dirige-se em direção centrípeta ao núcleo da célula hospedeira. O corpúsculo inicial já formado sofre fissão binária para formar novos corpúsculos. O tempo de geração dura, mais ou menos, de 2 a 3 horas. Aumenta o número de corpúsculos iniciais, aumentando também o tamanho das inclusões para formar a característica capa semilunar ao redor do núcleo da célula hospedeira. Após 10 a 15 horas, o DNA volta a ser detectável. Os corpúsculos iniciais são substituídos por numerosos corpúsculos elementares. Em cerca de 36 horas após a infecção, as inclusões maduras liberam os corpúsculos infectantes pela ruptura das membranas das células hospedeiras, (SILVA FILHO; LONGATTO FILHO, 2000). (Figura 1).

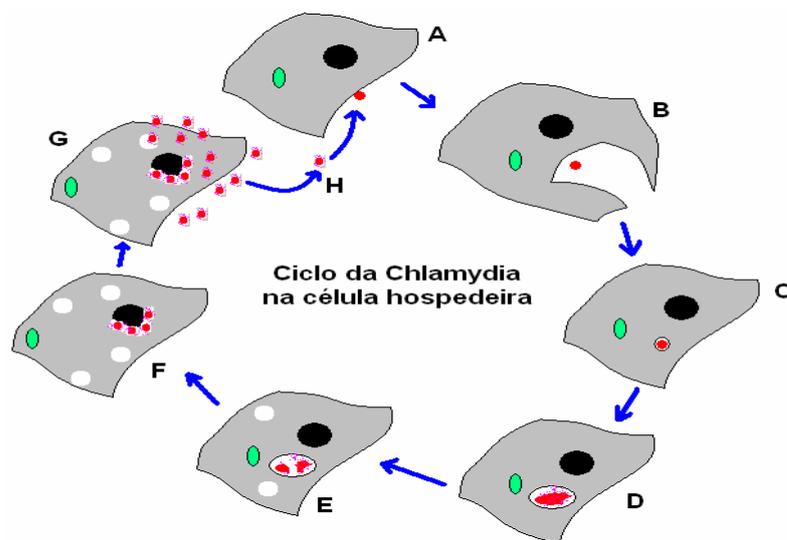


Figura 1 – Ciclo da *Chlamydia trachomatis* na célula hospedeira.

3.4 Prevalência da Infecção

No Brasil, desconhece-se a incidência da infecção urogenital por *C. trachomatis*, posto que seu diagnóstico possui dificuldades práticas na maioria dos centros diagnósticos de saúde pública. De acordo com revisão feita por Miranda *et al.* (2003), as taxas de prevalência da infecção pela *C. trachomatis* em mulheres brasileiras relatadas na literatura científica encontra-se situada entre 0,6 a 20,2% .

Codes *et al.* (2002), estudando freqüentadoras de uma clínica de planejamento familiar na Bahia, encontraram altas taxas de infecção por *Chlamydia* (11%) entre uma população de mulheres que, de modo geral, referiram comportamentos de baixo risco. Esses autores observaram, que nos Estados Unidos, uma variedade de estudos realizados tem demonstrado que as infecções por *Chlamydia* e gonococo têm alta prevalência entre as usuárias de planejamento familiar, variando de 4,5% a 12,4% para *C. trachomatis*.

3.5. Sintomas

Não existem sintomas absolutamente específicos para a infecção genital por *Chlamydia*. Tem-se demonstrado que mulheres com infecções cervicais pela *C. trachomatis* não apresentam qualquer sinal ou sintoma clínico característico, embora se tenha verificado que pelo menos alguns casos poderiam apresentar cervicite folicular característico (MELLES *et al.*, 2000). O que se observa, de um modo geral, são queixas comuns também a outras doenças sexualmente transmissíveis, como o corrimento vaginal e/ou dor pélvica.

Tem ocorrido uma maior prevalência da infecção em mulheres com alguns sintomas, dos quais a maioria corrimento e/ou sintomas de cervicite (BARBERIS *et*

al., 1997). Os principais sintomas são os de cervicite compreendendo corrimento e/ou desconforto pélvico (NAUD, 2004).

No exame ginecológico, pode-se notar corrimento cervical mucopurulento e/ou sangramento fácil do colo do útero, embora tais sinais não tenham sensibilidade nem especificidade para infecção pela *Chlamydia* (SCHACHTER, 1978, *Apud* MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003)

Existem evidências que comprovam a prevalência da infecção por *Chlamydia* em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil, onde foi observado que 60% das mulheres infectadas não apresentam sintomas (CODES *et al.*, 2002). Ravel (1997) relata que, cerca de 60% a 80% dos casos de mulheres infectadas são assintomáticos.

Em estudos na cidade de Manaus, relacionando os achados ao exame de colo uterino com a presença de infecção por *C. trachomatis*, mostrou-se que um maior número (17,1%) apresentava apenas leucorréia e outro (10,1%) leucorréia e mácula associada (ALENCAR, 1993).

A uretrite se manifesta com prurido uretral associado com eritema do meato e aparecimento de gota viscosa matinal à compressão do pênis. Torna-se mais espessa e amarela, apresentando prurido uretral (FRIAS *et al.*, 2001).

3.6 Doenças Causadas

Nas mulheres, no nível genital, a zona de junção escamocolunar e a endocérvice são as mais atingidas (BRUNHAM *et al.*, 1983). A *C. trachomatis* propaga-se da endocérvice às trompas, através do endométrio, portanto, do quadro de uma cervicite poderá haver uma anexite, ou seja, um quadro de doença inflamatória pélvica (DIP) com conseqüente esterilidade (DE PALO, 1996).

No homem, além da uretrite, pode causar epidimite aguda e prostatite, por infecção ascendente (STAMM, 1988 ; FRIAS *et al.*,2001).

A localização da *C. trachomatis* nas trompas de falópio deriva em uma obstrução bilateral das trompas e, conseqüentemente em infertilidade e complicações ectópicas (PÁNUCO *et al.*, 2000; CATES ; WASSERHEIT,1994).

Aproximadamente 75% das mulheres infectadas apresentam infecção endocervical, enquanto cerca de 50% possuem infecção uretral, e 25% retal (RAVEL,1997).

A localização endocervical do microorganismo pode transmitir-se ao neonato ao passar pelo canal do parto e produzir infecções neonatais, como: conjuntivite de inclusão e/ou pneumonia no recém nascido (BARBERIS *et al.*,1997; VARELLA *et al.*, 2000).

Em estudo onde se estabeleceu a prevalência da infecção por *C. trachomatis* em uma população com problemas da reprodução, observou-se que, em pesquisa de antígenos de *Chlamydia* por imunofluorescência direta, 43,6% das pacientes foram positivas (ANGELES *et al.*, 1999).

Sharma; Aggarwal e Arora (2002) mostram a prevalência de infecção chlamydiana pela detecção de anticorpos IgG anti-chlamydia em 68% das mulheres com infertilidade.

A Infecção por *Chlamydia* pode evoluir e produzir uma variedade de quadros infecciosos. Tem sido relatado ser a *C. trachomatis* uma das causas mais comuns de uretrite, nos homens e cervicite, nas mulheres sexualmente ativas (MELLES *et al.*, 2000).

A *C. trachomatis* é o agente causador de doenças do trato urogenital, linfogranuloma venéreo, tracoma, conjuntivite de inclusão e pneumonia no recém-

nascido. Um dos fatores de risco para a infecção é a prática sexual entre adolescentes. A recorrência das infecções é comum. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de desenvolver seqüelas e a chance de contrair a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (SEADI *et al.*, 2002).

3.7 Diagnóstico Laboratorial

Várias técnicas têm sido utilizadas para o isolamento, identificação e estudo da *Chlamydia trachomatis*. Atualmente, mesmo com os avanços do diagnóstico laboratorial, eles ainda permanecem difíceis de executar e têm aplicação limitada.

O diagnóstico da infecção pela *C. trachomatis* ainda é crítico, devido à freqüência de infecções assintomáticas (SEADI *et al.*, 2002).

Tradicionalmente, a cultura celular vem sendo bastante considerada no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*, porém recentemente outras técnicas para a detecção de antígenos vêm sendo utilizadas, como: a imunofluorescência, ELISA, hibridização de DNA e PCR. (GUERRA *et al.*, 1995 ; MIRANDA *et al.*,2003).

Devido ao fato de a infecção por *Chlamydia* quando não tratada, poder apresentar graves conseqüências, as normas-padrão dos serviços de planejamento familiar nos Estados Unidos foram expandidas para incluir o exame de rotina para essas doenças. Após a implementação rotineira desses exames por mais de 10 anos, observou-se em algumas regiões um declínio significativo na prevalência de infecção por *Chlamydia* e gonorréia. No Brasil, a detecção das DST não é um procedimento de rotina, sendo efetuada apenas quando as mulheres apresentam sintomas, e se há recursos disponíveis para o processamento dos espécimes (CODES *et al.*, 2002).

➤ CULTURA CELULAR

A cultura é uma das técnicas diagnósticas mais precisa, considerada por muito tempo como o padrão-ouro para identificação da *C. trachomatis*. Entretanto, seu custo extremamente elevado e a necessidade de utilização de técnicas sofisticadas, com meios de culturas em células vivas, tornam este método impraticável dentro da realidade brasileira.

➤ IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

A detecção de antígeno de *C. trachomatis* através do ELISA mostra uma sensibilidade variando entre 33,3% e 100% e especificidade 92,62% e 100% (PÁNUCO *et al.*, 2000 ; VINETTE-LEDUC *et al.*, 1997).

➤ IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A Imunofluorescência direta (IFD), utilizando anticorpos monoclonais marcados com fluorescência é uma das técnicas mais empregadas nos laboratórios que não podem utilizar o cultivo celular ou outras técnicas mais modernas e sensíveis, devido ao alto custo para sua realização. Permite antecipar o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*, pelo menos, 24 horas do tempo que seria necessário usando-se técnicas convencionais, como, por exemplo, a cultura. Foi constatado que, através da imunofluorescência direta em espécimes clínicos endocervicais, pode-se chegar a um diagnóstico de infecção por *Chlamydia* em aproximadamente 30 minutos, sendo então, de extrema valia e, do ponto de vista dos autores, suficientes para o diagnóstico e controle epidemiológico da infecção urogenital por *C. trachomatis* (ALENCAR *et al.*, 1993).

No comércio existem anticorpos monoclonais fluoresceinados que estão dirigidos contra a proteína principal da membrana externa, assim como contra lipopolissacarídeos. Esses últimos têm-se demonstrado mais específicos, que os anticorpos contra proteína principal de membrana externa, os quais, são mais sensíveis e menos específicos (GUERRA *et al.*, 1995).

O princípio da técnica de IFD baseia-se na identificação da *C. trachomatis* por meio de um anticorpo monoclonal conjugado com fluoresceína. O anticorpo reage com a principal proteína da membrana externa ou lipopolissacarídeos dos corpos de inclusão e dos corpos reticulados, e permite detectar a totalidade dos 15 sorotipos de *C. trachomatis* (A,B, Ba,C,D,E,F,G,H,I,J,L1,L2 E L3). Quando depositado sobre uma lâmina contendo a amostra, o anticorpo monoclonal reage com o antígeno presente na amostra. Uma fase de lavagem permite eliminar o anticorpo não ligado. Observadas ao microscópio de fluorescência, as amostras clínicas diretas infectadas por *Chlamydia* apresentam uma fluorescência de cor verde maçã, característica nos corpos de inclusão, sobre fundo contra-corado em vermelho (BIO-RAD®).

A imunofluorescência apresenta sensibilidade entre 70 e 100% e especificidade entre 95 e 100%, segundo Barnes (1989). Confirmando estes valores, estão os estudos de Martines (1991), Thejls *et al.* (1994), que demonstram sensibilidade entre 77,8% e 92%, além de especificidade entre 98% e 99,5%.

Estudos mostram também uma prevalência de 3,6-43,6%, da infecção pela *C. trachomatis*, detectada pelo método de IFD (STINGHEN, 2003 ; ANGELES *et al.*,1999).

Em estudos da prevalência das infecções por *C. trachomatis* em população, utilizando-se a técnica de imunofluorescência direta em que foram examinados 161 esfregaços cérvico-vaginais de pacientes atendidas pelo Instituto Adolfo Lutz,

laboratório J de Taubaté (SP), trinta e três casos (20,5%) tiveram teste positivo para *C. trachomatis* (CAVALIERE *et al.*, 1989). Assim, também, a presença de corpos elementares de *C. trachomatis* pôde ser demonstrada em 42 das 453 mulheres estudadas, através de um estudo prospectivo observacional, realizado em um serviço de citopatologia no centro Hospitalar 20 de Novembro, no México (MEJIA *et al.*, 1989). Ainda, utilizando o mesmo diagnóstico, 43,6% das pacientes foram positivas. Angeles *et al.* (1999); Alencar *et al.* (1993) detectaram em serviço de colpocitologia oncótica preventiva, na cidade de Manaus, *C. trachomatis* em 54 das 199 pacientes examinadas (27,1%). A faixa etária mais acometida pela infecção foi a de 21 a 30 anos, sendo este também o maior grupo examinado.

➤ DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As técnicas de detecção antigênica por amplificação do DNA da *C. trachomatis* (PCR e LCR), têm assumido importante papel diagnóstico na rotina clínica dos países desenvolvidos, apresentando sensibilidade e especificidade superiores às culturas em células de Mc Coy, estando, contudo, o seu emprego muito restrito para a nossa realidade (FRIAS *et al.*, 2001). A sensibilidade e especificidade encontrada estão em 100% (PÁNUCO *et al.*, 2000).

➤ CITOLOGIA ONCÓTICA CÉRVICO-VAGINAL

Gupta *et al.* (1979) propuseram a identificação (anteriormente descrita) da *C. trachomatis* nos esfregaços cervicais de rotina.

Utilizando a imunoperoxidase em esfregaços descorados de Papanicolaou, Shiina (1985) define os aspectos morfológicos nos esfregaços de cervicites por *C. trachomatis*, separando os vacúolos vinculados a este agente dos vacúolos do

muco. A coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS), após digestão com amilase, permite diferenciar a mucina intracitoplasmática do glicogênio produzido pela *C. trachomatis*. Borges e Vera (1986) confirmaram que a *C. trachomatis* pode ser reconhecida nos esfregaços corados pelo método de Papanicolaou, relatando que o estudo citomorfológico (Papanicolaou) seria um exame útil para o diagnóstico da *C. trachomatis*, em grandes grupos de população que procuram consultas ginecológicas nos hospitais e que não sobrecarregam economicamente a instituição, já que este exame se realiza rotineiramente para a pesquisa de lesões neoplásicas no colo uterino.

Posteriormente, Gupta *et al.* (1988), procurando critérios morfológicos que pudessem aumentar o valor diagnóstico da técnica de Papanicolaou, verificaram que o achado mais freqüente foi a presença de grupos de células metaplásicas com citoplasma finamente vacuolizado, com aparência moth-eaten (“comido de traça”), Esses vacúolos delimitados por membranas finas, mas bem definidos, continham no interior estruturas puntiformes eosinofílicas, compatíveis com corpúsculos elementares.

Dada a alta incidência de infecções por *C. trachomatis* no trato genital feminino, Cavaliere *et al.* (1989) teria considerado o método de Papanicolaou, em esfregaço contendo material endocervical, a primeira opção de exame para detecção deste agente. Através dessa técnica, foram considerados sugestivos de infecção por *C. trachomatis* os casos que apresentavam fina vacuolização nas células endocervicais e/ou metaplásicas. Quando comparado a imunofluorescência, a citologia oncótica cérvico-vaginal mostrou alta sensibilidade (91,6%). Utilizando ainda a técnica de Papanicolaou, os autores observaram a presença de corpos de inclusão em 87 pacientes. Em uma de cada duas mulheres com o Papanicolaou

sugestivo de infecção por *C. trachomatis*, foi confirmado através da técnica de imunofluorescência. Mostrando então, a eficiência do Papanicolaou como técnica diagnóstica, pois a sensibilidade foi de 27% e especificidade de 80% (MEJIA *et al.*, 1989).

Segundo Maeda *et al.* (1991), os esfregaços citológicos mostrando metaplasia madura bem característica deverão ser escrutinados com redobrado cuidado, pois são nestes casos que mais freqüentemente são encontradas alterações citopáticas por *C. trachomatis*.

Foram estudadas 129 mulheres da triagem, no Departamento de Ginecologia do Hospital A.C. Camargo – São Paulo, através do diagnóstico citológico, em que 44 pacientes (34,3%) apresentavam infecção pela *C. trachomatis*, das quais 42 (32,5%) foi confirmado pela imunofluorescência. Todos os agentes foram encontrados em material que continha células endocervicais e/ou metaplásicas (SHIRATA *et al.*, 1992). No mesmo ano, estudo avaliou pacientes atendidas em clínica de DST, Bombay -Índia, sendo verificado que as amostras de Papanicolaou não são úteis no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* (PANDIT *et al.*, 1992).

Em um serviço de diagnóstico precoce e terapia ginecológica de tumores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade de Catania, Garozzo *et al.* (1993) evidenciaram que o Papanicolaou permite ser o principal teste para *screening* da população de risco, devendo, contudo, ser seguido por um diagnóstico correto por imunofluorescência com anticorpo monoclonal para *C. trachomatis*.

Considerando como padrão ouro à cultura de células para o diagnóstico da *C. trachomatis* e utilizando como critério à presença de células metaplásicas contendo corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticas, observou-se que 3 das 11 pacientes (27,3%) com cultura positiva tiveram os esfregaços corados pelo Papanicolaou

interpretados como sugestivos de infecção por *Chlamydia* e 10 das 59 mulheres (16,9%) com cultura negativa apresentaram no Papanicolaou critérios morfológicos satisfatórios para o diagnóstico da infecção (sensibilidade 27,3% e especificidade 83,1%) (RADDI; SOARES, 1994).

Caudill *et al.* (1994) em Rochester, evidenciaram que a citologia não é efetiva na determinação da presença de *Chlamydia*.

Reyes-Maldonado *et al.* (1996) evidenciaram que a maior incidência da infecção por *C. trachomatis* foi detectada pelo método citológico quando em comparação com as técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase.

Vinette-Leduc *et al.* (1997) mostram que o ELISA e a citologia são técnicas insensíveis comparados com a PCR. Segundo os autores, a citologia não deveria ser usada para diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* em mulheres assintomáticas em população com moderado risco de infecção. A sensibilidade e especificidade da citologia foi de 13,3% e 90%, respectivamente, enquanto a sensibilidade e especificidade para o ELISA foi de 33,3% e 100%, respectivamente.

A infecção por *C. trachomatis* provoca efeitos citopáticos importantes que podem ser reconhecidos citologicamente pela técnica de Papanicolaou. O que se discute é a sensibilidade e especificidade da técnica. Não se pode esquecer que o exame citológico periódico tem, como objetivo principal, prevenir o câncer do colo uterino; as informações adicionais são recompensa de um trabalho bem feito (SILVA FILHO; LONGATTO FILHO, 2000).

Em estudo realizado por Pánuco *et al.* (2000), no México, constatou-se que as técnicas de Papanicolaou e PCR foram adequadas para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. ELISA não foi confiável e, portanto, não é recomendado para ser usado como técnica diagnóstica em mulheres grávidas em populações de baixo

risco e baixa prevalência. Evidenciaram-se a sensibilidade 100% e especificidade 99,18%, para Papanicolaou; sensibilidade 100% e especificidade 100%, para PCR, tendo-se como padrão-ouro a PCR.

Stinghen, Nascimento e Leonart (2004) observaram uma prevalência de *C. trachomatis* de 3,7%, com sensibilidade de 37,5%, especificidade de 100%, taxa de erro falso positivo zero e taxa de erro falso negativo de 62,5% para o método de Papanicolaou, quando comparado a IFD. Este estudo, apresentou elevada especificidade, apesar de ser limitado em relação a sua sensibilidade.

A citopatologia tem sido testada estatisticamente em relação a outras técnicas e defende-se não haver mais dúvidas com relação a sua especificidade. Com relação à sua sensibilidade, vem progressivamente aumentando com o aprimoramento dos profissionais e a definição dos critérios morfológicos de diagnóstico.

4 AMOSTRAS E MÉTODOS

4.1. Local e População de Estudo

O estudo foi realizado no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros, da Universidade de Pernambuco- CISAM-UPE, no ambulatório, setor de coleta de citologia oncológica cérvico-vaginal, no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)-Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), setor de imunologia e no laboratório de citologia clínica, Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde (CCS) –UFPE.

A população envolvida na pesquisa foi constituída por mulheres que freqüentavam o serviço do CISAM-UPE, no período de 19/07/2004 a 18/10/2004, diariamente, para realização de citologia oncológica cérvico-vaginal. A faixa etária analisada foi de 18 a 35 anos, tendo sido selecionadas 171 pacientes, utilizando-se os critérios de inclusão e exclusão.

4.2. Critérios de Inclusão da Amostra

- Freqüentar o serviço ambulatorial do CISAM para realização do exame preventivo do câncer de colo de útero;
- Ter iniciado atividade sexual;
- Ser da faixa etária entre 18 e 35 anos;
- Aceitar participar do estudo de maneira livre e esclarecida

4.3. Critérios de Exclusão da Amostra

- Ter realizado Histerectomia;
- Estar em período menstrual;
- Estar em período gestacional

4.4. Desenho do Estudo

O tipo de estudo adotado foi transversal, onde comparamos as técnicas de imunofluorescência direta e citologia oncótica cérvico-vaginal, além das variáveis, citadas posteriormente e quando utilizadas como meio de diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*.

4.5. COLETA

4.5.1. Coleta de Dados

4.5.1.1 Procedimentos para Coleta de Dados

Após aprovação do projeto, pelo Comitê de Ética em pesquisa da UPE (Nº 069/04) (Anexo A), as pacientes incluídas na pesquisa, seguindo critérios de inclusão descritos anteriormente, foram consultadas a participar da pesquisa mediante a assinatura de um termo livre e esclarecido de consentimento (Anexo B) baseado na resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde. A coleta foi realizada no CISAM, no horário da manhã, no período de 19/07/2004 a 18/10/2004, com a aplicação de um questionário padronizado (Anexo C), o qual continha nome, idade, história obstétrica, sintomas.

4.5.2 Coleta de Amostras

Citologia oncótica cérvico-vaginal

Após introdução do espéculo vaginal nas pacientes devidamente selecionadas, foi coletado material da ectocérvice e endocérvice. A coleta dupla foi realizada em primeiro lugar na área da ectocérvice com a espátula de Ayre, apoiando a sua extremidade mais longa no orifício cervical externo e então dispendo o material sobre a lâmina. Logo em seguida, foi coletado material endocervical com

escovinha específica, introduzindo-a no canal cervical, percorrendo todo o seu contorno e dispendo o mesmo material delicadamente sobre a mesma lâmina. A extremidade fosca da lâmina previamente limpa, continha a identificação da paciente (iniciais do seu nome e n° do registro).

Imunofluorescência direta

A amostra para imunofluorescência era constituída apenas por material endocervical (SOS CORPO, 1998).

4.6. PROCEDIMENTOS E EXAMES LABORATORIAIS

4.6.1. Fixação da Amostra

Após a coleta, o esfregaço da citologia oncótica cérvico-vaginal foi fixado imediatamente, segundos após a coleta, utilizando **álcool etílico 99,5%** (SOS CORPO, 1998). A outra amostra proveniente da endocérvice, foi submetida à fixação em acetona PA.

4.6.2. Exames Laboratoriais

4.6.2.1. Citologia cérvico-vaginal

❖ Coloração

Após fixação, as amostras foram submetidas à coloração de Papanicolaou simplificada:

- Água – 1 minuto
- Hematoxilina – 15 segundos
- Água corrente
- Álcool 99,5% - 2 minutos
- Álcool – 2 minutos
- Orange G 6 – 5 mergulhos

- Álcool – 2 minutos
- Álcool –2 minutos
- EA – 4 minutos
- Álcool - 2 minutos
- Álcool – 2 minutos
- Xilol + álcool – 2 minutos
- Xilol P.A – 2 minutos

❖ **Montagem**

Após coloração e secagem, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas 24x50mm.

❖ **Análise microscópica.**

Os esfregaços foram analisados em microscópio óptico NiKon Eclipse E200, nos aumentos de 100X e 400X.

4.6.2.2. Imunofluorescência direta

A outra lâmina coletada, fixada em acetona, foi submetida à técnica de imunofluorescência direta, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-*Chlamydia trachomatis*.(BIO-RAD®).

❖ **Imunofluorescência direta para *Chlamydia trachomatis* (BIO-RAD®)**

O sistema de detecção do antígeno de *C. trachomatis* (Pathfinder) é constituído por anticorpo monoclonal conjugado com fluoresceína que identifica as inclusões de *Chlamydia* em amostras clínicas diretas.

Princípios do Método

Identificar a *C. trachomatis* por meio de um anticorpo monoclonal conjugado com fluoresceína. O anticorpo monoclonal reage com a principal proteína da membrana externa dos corpos elementares, corpos de inclusão ou corpos reticulados, e permite detectar a totalidade dos 15 sorotipos de *C. trachomatis* (A,B, Ba,C,D,E,F,G,H,I,J,L1,L2 E L3). Quando depositado sobre uma lâmina contendo a amostra, o anticorpo monoclonal reage com o antígeno presente na amostra. Uma fase de lavagem permite eliminar o anticorpo não ligado. Observados ao microscópio de fluorescência, os esfregaços com células infectadas por *Chlamydia* apresentam uma fluorescência de cor verde maçã, característica, sobre fundo contra-corado em vermelho.

Procedimentos do Teste

1. Retirava-se uma amostra controle da geladeira e deixava-se a Lâmina estabilizar a temperatura ambiente sem retirar da embalagem (5 a 10 min).
2. As amostras das pacientes eram retiradas dos recipientes de conservação e juntamente com a amostra eram colocadas na câmara úmida na temperatura ambiente, após se depositar uma gota (cerca de 30µl) do anticorpo monoclonal em cada área das lâminas contendo teste.
3. Após 15 minutos de incubação.
4. Lavava-se abundantemente as lâminas com água destilada por 10 a 15 segundos eliminando-se o excesso de anticorpos não fixados e deixou-se escorrer até secar.
5. Em seguida depositava-se uma gota de meio de fixação em cada poço e cobria-se com uma lamínula, evitando formação de bolhas de ar.

6. A seguir as amostras eram examinadas ao microscópio de fluorescência, com uma ampliação de 400X e confirmava-se no aumento de 1000X (imersão).

Interpretação dos resultados

Considerou-se uma amostra positiva a que apresentou corpos extracelulares visíveis com uma ampliação de 1000X, Esses corpos apresentam-se como elementos arredondados, de contornos regulares, com uma cor de fluorescência verde maçã uniforme. A amostra urogenital com, pelo menos, 5 corpos fluorescentes por poço foi considerada como positiva. A BIO-RAD® recomenda este *cut-off* a fim de reduzir o risco de resultados falsamente positivos, que seriam devidos a uma interpretação incorreta de uma fluorescência não específica.

4.7. Variáveis do Estudo

As variáveis selecionadas e utilizadas neste estudo foram as seguintes:

Variáveis:

- Idade
- Sintomas clínicos
- História obstétrica
- Microorganismos morfológicamente classificados
- Antígenos de *Chlamydia trachomatis*
- Alterações citológicas sugestivas de *C. trachomatis*
- Lesões pré-malignas
- Componente endocervical e/ou da zona de transformação
- Alterações celulares benignas

4.7.1. Definição das Variáveis

As variáveis utilizadas neste estudo estão definidas a seguir, sendo dispensadas as descrições para dados auto-explicativos:

- Sintomas clínicos: presença de sintomas clínicos, comuns a DST, como corrimento vaginal e/ou desconforto pélvico, foram considerados.
- História obstétrica: definição da história clínica das pacientes, considerando dificuldade para engravidar, aborto, gestações e aquelas pacientes sem nenhum dado obstétrico.
- Microorganismos morfológicamente classificados: através da citologia oncológica cérvico-vaginal. Presença de um ou mais dos microorganismos relacionados a seguir, detectados em qualquer amostra citológica analisada: bacilos, cocos, cocobacilos sugestivos de *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Actinomyces spp*, *Cândida spp* e efeito citopático do Herpes vírus.
- Antígenos de *C. trachomatis*: presença de antígenos de *C. trachomatis*, representados sob a forma de corpúsculos elementares e/ou corpúsculos de inclusão, sendo evidenciados através da reação de imunofluorescência direta, sendo considerados positivos as amostras endocervicais que apresentaram fluorescência com pelo menos 5 corpos de inclusão por poço, de acordo com a metodologia utilizada.
- Alterações citológicas sugestivas de *C. trachomatis*: evidência de efeito citopático em células epiteliais glandulares endocervicais e/ou metaplásicas escamosas, segundo critérios definidos por Gupta *et al.* (1988).

- Lesões pré-malignas: alterações em células epiteliais escamosas correspondendo a Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) compreendendo neoplasia intra-epitelial cervical- (NIC I) e/ou Infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e Lesão Intra-Epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) compreendendo NIC II ou III. (SOLOMON; NAYAR, 2005).
- Componente endocervical e/ou da zona de transformação: presença de células glandulares endocervicais e/ou metaplásicas escamosas nas amostras cérvico-vaginais.
- Alterações Celulares Benignas: presença de alterações celulares reativas de natureza benigna, associadas à inflamação, radiação, uso de dispositivo intra-uterino (DIU) ou outras causas inespecíficas, sendo elas citoplasmáticas e nucleares. (SOLOMON; NAYAR, 2005).

4.7.2. Categorização das variáveis

➤ **Idade**

As pacientes foram distribuídas em quatro faixas-etárias conforme a idade:

- 1- De 18 a 22 anos;
- 2- De 23 a 27 anos;
- 3- De 28 a 32 anos;
- 4- De 33 a 37 anos

➤ **Sintomas clínicos**

As pacientes foram distribuídas em duas categorias, conforme sintomas clínicos:

Sintomáticas

Assintomáticas

➤ **História obstétrica**

A variável história obstétrica foi distribuída em seis categorias:

- Um aborto + dificuldade para engravidar
- Um aborto
- Dois abortos
- História obstétrica normal
- Sem história obstétrica

➤ **Antígenos de *C. trachomatis***

A variável antígenos de *C. trachomatis* foi distribuída em duas categorias:

Positivo

Negativo

➤ **Alterações citológicas sugestivas de *Chlamydia trachomatis***

A variável alterações morfológicas sugestivas de *C. trachomatis* foi relatada quando se evidenciou efeito citopático de *C. trachomatis* nas células.

➤ **Lesões pré-malignas**

A variável lesões pré-malignas foi distribuída em 2 categorias:

LSIL

HSIL

➤ **Componente celular endocervical e/ou da zona de transformação**

A variável componente celular endocervical e/ou da zona de transformação, foi distribuída em 3 categorias:

Células glandulares endocervicais

C. glandulares endocervicais + metaplásicas escamosas

C. metaplásicas escamosas

➤ **Alterações Celulares Benignas**

A variável alterações celulares benignas foi citada como:

Alterações benignas

4.8. **Cálculo da sensibilidade e especificidade da citologia oncótica cérvico-vaginal**

Foram utilizados os dados da tabela 1 para cálculo da sensibilidade e especificidade da citologia oncótica cérvico-vaginal.

Tabela 1: Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença (Ferreira; Ávila, 1996).

TESTE	DOENÇA- Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	positivos verdadeiros A	positivos falsos B
Negativo	negativos falsos C	negativos verdadeiros D

4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise, utilizando-se o programa estatístico SPSS para Windows. Foi feita a análise descritiva de todas as variáveis do estudo, as quais foram apresentadas em valores absolutos e relativos.

5 RESULTADOS

As características gerais das pacientes estão descritas na tabela 2

Tabela 2 - Distribuição das pacientes estudadas segundo idade, sintomas clínicos e história obstétrica.

VARIÁVEIS	N	%
Idade (faixa-etária)		
18-22	31	18,1
23-27	52	30,4
28-32	53	31,0
33-37	35	20,5
Sintomas Clínicos		
Sintomáticos	85	49,7
Assintomáticos	86	50,3
História Obstétrica		
Dif p/ Engravidar	02	1,2
Aborto	09	5,3
Aborto+ Dif. P/ Engrav.	01	0,6
H. obstétrica normal	122	71,3
Sem história obstétrica	37	21,6
TOTAL	171	100

DIF – DIFICULDADE; ENGRAV – ENGRAVIDAR; H- HISTÓRIA

Tabela 3 - Microorganismos morfológicamente classificados em citologia cérvico-vaginal na amostra analisada.

MICROORGANISMOS	N	%
<i>LaC. trachomatisobacilos</i>	11	6,4
<i>Bacilos</i>	35	20,5
<i>Bacilos e Cândida spp.</i>	04	2,3
<i>Cocos e Cândida spp.</i>	01	0,6
<i>Cocos e Trichomonas vaginalis</i>	01	0,6
<i>Cocos, Bacilos e Cândida spp.</i>	04	2,3
<i>Cocos, Bacilos e Trichomonas vaginalis</i>	04	2,3
<i>Cocos e Bacilos</i>	59	34,5
Cocos, Bacilos e HPV	01	0,6
Sugestivo de <i>Gardnerella</i> e AC. <i>trachomatinomyces spp.</i>	01	0,6
Sugestivo de <i>Gardnerella</i> e <i>Cândida spp.</i>	01	0,6
Sugestivo de <i>Gardnerella</i> e Efeito do Herpes <i>vírus</i>	01	0,6
Sugestivo de <i>Gardnerella</i> e <i>Bacilos</i>	01	0,6
Sugestivo de <i>Gardnerella</i> e <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i>	03	1,7
Sugestivo de <i>Gardnerella vaginalis</i>	41	24,0
Cocos, Bacilos e Sugestivo de <i>C. trachomatis</i>	01	0,6
Esfregaço Insatisfatório	01	0,6
Indeterminado	01	0,6
TOTAL	171	100

Tabela 4 - Descrição das pacientes segundo alterações celulares, morfologia sugestiva de *C. trachomatis*, antígenos de *C. trachomatis* e presença de componente endocervical e/ou zona de transformação.

VARIÁVEIS	N	%
Alterações celulares		
Alterações benignas	118	69
Alterações benignas + sugestivo de <i>C. trachomatis</i>	01	0,6
Alterações pré-malignas		
LSIL	05	2,9
HSIL	02	1,2
Esfregaço insatisfatório	01	0,6
Sem alterações assinaláveis	44	25,7
Antígenos de <i>Chlamydia trachomatis</i>		
Positivo	06	3,5
Negativo	165	96,5
Componentes celulares endocervical e/ou zona de transformação		
Células glandulares endocervical	72	42,1
C. glandulares endocervical e metaplásicas escamosas	58	33,9
C. metaplásicas escamosas	13	7,6
Ausência de ambas	27	15,8
Esfregaço insatisfatório	01	0,6

De acordo com os resultados da tabela 2, a faixa-etária mais estudada, estava situada entre 23 e 32 anos, correspondendo a 61,4%. Seguido de 18,1% entre 18 e 22 anos, e 20,5% tinham entre 33 a 37anos.

Em relação aos sintomas clínicos não houve diferença significativa entre pacientes sintomáticas (49,7%) e assintomáticas (50,3%).

Apenas 10 pacientes (5,9%) relataram história de aborto, enquanto que 2 (1,2%) apresentavam dificuldade para engravidar.

De acordo com a tabela 3, os microorganismos morfologicamente classificados mais freqüentes foram cocos e bacilos (flora mista) e cocobacilos sugestivos de *Gardnerella vaginalis* e/ou *Mobiluncus spp.*

Conforme a tabela 4, as alterações celulares benignas foram observadas em 69% das amostras e em apenas uma (0,6%) havia características sugestivas de infecção por *C. trachomatis*. Já as alterações celulares correspondentes a lesões pré-malignas (compreendendo LSIL e HSIL) foram observadas em 4,1% das amostras analisadas.

A pesquisa de antígenos de *Chlamydia trachomatis*, através da IFD, apresentou 3,5% de positividade nas amostras estudada.

Os componentes celulares endocervical e/ou da zona de transformação (células metaplásicas), foram observados em 83,6% das amostras.

❖ **Achados citológicos com sintomas clínicos**

A maior parte das pacientes que relataram algum sintoma clínico, apresentava algum tipo de alteração celular, 69/85 (81,2%), enquanto que delas apenas 01 (0,6%) mostrou ser esta alteração sugestiva de *C. trachomatis* (Tabela 5).

Tabela 5- Achados citológicos com sintomas clínicos das pacientes estudadas.

CITOLOGIA	SINTOMAS		TOTAL
	ASSINTOMÁTICAS	SINTOMÁTICAS	
E. I		1	1
ALT.BENIGNAS	55	63	118
HSIL		2	2
LSIL	2	3	5
SEM ALTERAÇÃO	29	15	44
SUGEST. DE <i>C. trachomatis</i>		1	1
TOTAL	86	85	171

E. I. – ESFREGAÇO INSATISFATÓRIO; HSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE AUTO-GRAU; LSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU.

❖ **Achados citológicos e os microorganismos morfológicamente classificados.**

Em relação aos microorganismos classificados morfológicamente, 125/171 (73,0%) pacientes mostravam estes agentes relacionados a algum tipo de alteração celular, enquanto que 44/171 (25,7%) pacientes não apresentavam nenhuma alteração celular na citologia cérvico-vaginal. Nestes, todavia, a presença de Bacilos ou Lactobacilos foi a flora observada. As pacientes estudadas, que apresentavam algum tipo de alteração celular, mostraram uma diversidade de microorganismos, sendo estes classificados como: cocobacilos sugestivos de *Gardnerella vaginalis* e/ou *Mobiluncus spp.*, cocos e bacilos, *Cândida spp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Actinomyces spp.*, efeito do vírus Herpes, além de efeito sugestivo de infecção por *C. trachomatis*. (Tabela 6), a seguir.

Tabela 6 - Achados citológicos e os microorganismos morfologicamente classificados.

MICROORGANISMOS	CITOLOGIA				
	ALTE.BENIG	HSIL	LSIL	SEM/ALTER	SUGEST.C.†
Bacilos/Candida	3			1	
Bacilos	4			31	
Cocos/Candida	1				
Cocos/Trichomonas	1				
Gardnerella/AC. <i>trachomatisinomyces</i>	1				
Gardnerella/Candida	1				
Gardnerella/ Herpes	1				
Gardnerella	37	1	3		
Gardnerella/Bacilos	1				
Gardnerella/Trichomonas	3				
LaC. <i>trachomatis</i> obacilos				11	
Mista/Cândida	4				
Mista/C. <i>trachomatis</i>					1
Mista/HPV			1		
Mista/Trichomonas	4				
Mista	56	1	1	1	
TOTAL	117	2	5	44	1

ALTE. – ALTERAÇÕES; HSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE AUTO-GRAU; LSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU; SUGEST. – SUGESTIVO; BENIG- BENIGNAS; Ct-*Chlamydia trachomatis*

Obs: UMA AMOSTRA CITOLÓGICA FOI INSATISFATÓRIA POR ESFREGAÇO PURULENTO
EM UMA AMOSTRA CITOLÓGICA A MICROBIOLOGIA FOI INDETERMINADA

❖ **Achados citológicos e faixa-etária**

A faixa etária em que mais predominaram alterações celulares foi a compreendida entre 23 e 27 anos, com 39/171 (22,8%) e 28 e 32 anos, com 36/171 (21,0%), sendo estas também as mais predominantes no estudo (Tabela 7).

Tabela 7- Achados citológicos e faixa-etária das pacientes estudadas

CITOLOGIA	FAIXA-ETÁRIA				TOTAL
	18-22	23-27	28-32	33-37	
E.I			1		1
ALT.BENIGNAS	21	37	34	26	118
HSIL	1		1		2
LSIL	3	2			5
SEM ALTER.	6	13	16	9	44
SUGEST.DE C. <i>trachomatis</i>			1		1
TOTAL	31	52	53	35	171

E. I – ESFREGAÇO INSATISFATÓRIO; HSIL – LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE AUTO GRAU; LSIL – LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU.

❖ **Achados citológicos e IFD para pesquisa de antígenos de *Chlamydia trachomatis*.**

Observou-se que, em apenas (1/6) das pacientes cuja imunofluorescência foi positiva para *C. trachomatis*, os achados citológicos foram compatíveis, ou seja, mostraram características sugestivas de *C. trachomatis*. (Figura 2 e 3, a seguir). Enquanto que as outras (5/6) pacientes apresentaram outras alterações celulares benignas (reatividade associada ou não a inflamação) não sugestivas de *C. trachomatis*. Das pacientes com lesão de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL), nenhuma delas estava relacionada à presença de antígenos de *C. trachomatis*, Tabela 8, p.40.

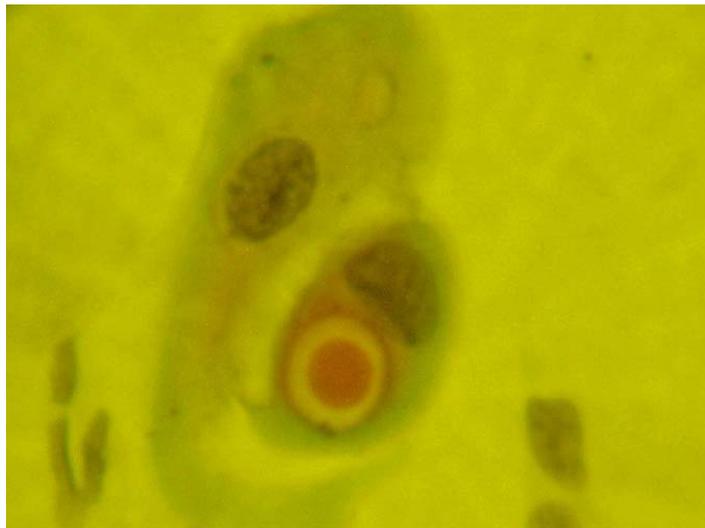


Figura 2 - Esfregaço cérvico-vaginal. Coloração de Papanicolaou. 400X *Chlamydia trachomatis*.

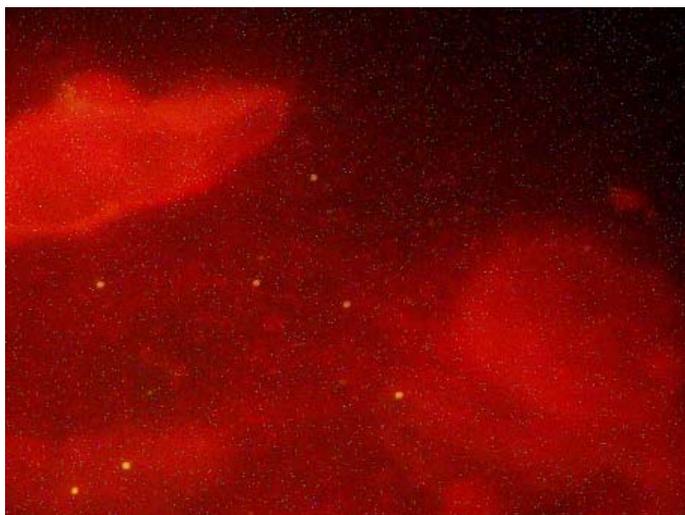


Figura 3 – IFD para *C. trachomatis*.

Tabela 8 - Achados citológicos e IFD para pesquisa de antígenos de *Chlamydia trachomatis*.

CITOLOGIA	IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA		TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	
E. I	1		1
ALT.BENIGNAS	113	5	118
HSIL	2		2
LSIL	5		5
SEM/ ALT.	44		44
SUGEST.DE <i>C.trachomatis</i>		1	1
TOTAL	165	6	171

E. I – ESFREGAÇO INSATISFATÓRIO; ALT- ALTERAÇÕES;SUGEST-SUGESTIVO; HSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE AUTO GRAU; LSIL- LESÃO INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU

❖ **Achados da IFD para *Chlamydia trachomatis* e os sintomas clínicos**

Observou-se que 4/6 das pacientes positivas para *C. trachomatis* na IFD relataram sintomas, enquanto que apenas 2/6 delas mostraram-se assintomáticas (Tabela 9), abaixo.

Tabela 9 - Achados da IFD para *Chlamydia trachomatis* e os sintomas clínicos.

IFD	SINTOMAS		TOTAL
	ASSINTOMÁTICAS	SINTOMÁTICAS	
NEGATIVO	84	81	165
POSITIVO	2	4	6
TOTAL	86	85	171

❖ **Pacientes positivas para *C. trachomatis* pela IFD e história obstétrica**

Apenas 1/6 das pacientes positivas para antígenos de *C. trachomatis* relatou história prévia de aborto, enquanto 4/6 relataram história obstétrica normal e 1/6 não teria tido filho ainda (Tabela 10, p. 42).

Tabela 10 - Imunofluorescência direta com a história obstétrica.

IFD	HISTÓRIA OBSTÉTRICA						TOTAL
	1AB /DE	1AB	2AB	DE	NORMAL	S/HIST.OBST	
NEGATIVO	1	7	1	2	118	36	165
POSITIVO		1			4	1	6
TOTAL	1	8	1	2	122	37	171

AB- ABORTO; DE- DIFICULDADE PARA ENGRAVIDAR; S- SEM; HIST- HISTÓRIA; OBST.- OBSTÉTRICA

❖ **Pacientes com reação de imunofluorescência positiva para *C. trachomatis* e faixa-etária**

As pacientes positivas para *C. trachomatis* por IFD estavam entre as duas faixas-etárias mais freqüentes no estudo, ou seja, 23-27 e 28-32 anos, sendo a positividade para *C. trachomatis* 4/6 e 2/6, respectivamente.

❖ **Positividade da reação de imunofluorescência para *C. trachomatis* e presença de componente celular endocervical e/ou da zona de transformação**

Todas as pacientes com positividade para *C. trachomatis* na IFD apresentavam células glandulares endocervicais e/ou metaplásicas escamosas na citologia, conforme (Tabela 11, p. 43).

Tabela 11 - Reação de IFD para *C. trachomatis* e presença de componente endocervical e/ou da zona de transformação.

IFD	CÉLULAS					TOTAL
	E. I	AUSÊNCIA	END	END E MET	MET	
NEGATIVO	1	27	69	56	12	165
POSITIVO			3	2	1	6
TOTAL	1	27	72	58	13	171

END- ENDOCERVICAIS; MET- METAPLÁSICAS.; E.I- ESFREGAÇO INSATISFATÓRIO

- ❖ **Sensibilidade e especificidade da citologia oncótica cérvico-vaginal, utilizando como padrão ouro a técnica de imunofluorescência direta. (Tabela 12).**

Tabela 12 - Sensibilidade e especificidade da citologia oncótica cérvico-vaginal

Resultado da citologia	Resultado da Imunofluorescência	
	Positivo	Negativo
Positivo	1	0
Negativo	5	0
Total	6	0

Sensibilidade (%): 16,6%

Especificidade (%): 100%

6 DISCUSSÃO

Barberis *et al.* (1997) relatam que um dos fatores de risco nas infecções seria a idade. O grupo etário mais afetado estaria compreendido entre 21 e 30 anos, devido a uma maior atividade sexual ou maior número de parceiros. No entanto Miranda *et al.* (2003) reportam que a baixa idade é um dos fatores de risco mais importantes. A idade inferior a 20 anos, ou a 25 anos, dependendo da população estudada, seria o principal fator de risco. Nosso estudo, todavia, observou que a faixa-etária com maior positividade para *C. trachomatis* foi a compreendida entre 23 e 27 anos (4/6), sendo as demais 28 e 32 anos (2/6). Com isso, observamos que a maior freqüência da infecção estaria nas proximidades da faixa etária citada por Barberis *et al.* (1997). No entanto, idades inferiores a 25 anos obtivemos apenas 1/6 com positividade.

Seadi *et al.* (2002) relatam que um fator limitante no diagnóstico da infecção por *Chlamydia* seria as infecções assintomáticas, embora a maioria dos estudos relacionados se preocupem mais em detectar populações sintomáticas, deixando escapar as de baixo risco sem sintomas. Neste estudo, não houve diferença significativa em relação às pacientes sintomáticas (49,7%) e assintomáticas (50,3%). Melles *et al.* (2000) isolaram *C. trachomatis* de material endocervical de 14 (8,4%) mulheres do grupo das assintomáticas. Ravel (1997) cita que 60-80% das mulheres infectadas por *C. trachomatis* são assintomáticas, confirmando estes achados Codes *et al.* (2002) observaram que 60% das mulheres infectadas não apresentam sintomas.

Barberis *et al.* 1997 constataram que 71,4% das mulheres com infecção por *C. trachomatis* foram sintomáticas e 28,6%, assintomáticas. Nossos achados

mostraram que do total de pacientes positivas para antígeno de *C. trachomatis*, apenas 2/6 (33,3%) mostraram-se assintomáticas e 4/6 (66,7%) relataram algum sintoma. No entanto, estes sintomas podem estar ou não relacionados à presença da infecção, pois pode existir a presença de outro microorganismo que também poderia expressar sintomas semelhantes. Assim, reafirmamos a conclusão de autores de que não existe, de fato, sintomas que se possa dizer específicos de infecção genital pela *C. trachomatis*. Não devendo, portanto, este parâmetro ser utilizado como hipótese diagnóstica.

A maior parte das pacientes estudadas não relatam queixas na sua história obstétrica, compreendendo 122/171 (71,3%) com história obstétrica normal e 37/171 (21,6%) sem história obstétrica. Porém, 10/171 (5,9%) já tiveram aborto e 2/171 (1,2%) teriam dificuldade para engravidar. Das pacientes com positividade para *C. trachomatis* através da IFD, apenas 1/6 (16,7%), apresentaram problema obstétrico (aborto), enquanto as 5/6, não relataram nenhum problema obstétrico. Angeles *et al.* (1999) evidenciaram uma freqüência de 43,65% de infecção em uma população com problemas de reprodução e Garozzo *et al.* (1993) relatam que as infecções são geralmente assintomáticas, mas em casos de aborto e esterilidade são razões para suspeitar da infecção.

Dos microorganismos morfológicamente classificados em nosso estudo, houve uma maior freqüência de flora mista (cocos e bacilos), em 69 (40,3%) dos casos e cocobacilos sugestivo de *Gardnerella vaginalis* e/ou *Mobiluncus spp.*, em 48 (28,1%) das pacientes. De Palo (2002) evidencia que a vaginose bacteriana acomete, aproximadamente, 35% das mulheres que procuram clínica de doenças sexualmente transmissíveis e, no mínimo, 5 a 15% das que procuram atendimento ginecológico de rotina.

A prevalência de *C. trachomatis* na população estudada foi de 3,5%. Estudos mostram prevalência desse microorganismo variando conforme origem das populações estudadas. Stinghen; Nascimento e Leonart (2004), em Curitiba-PR, encontraram 3,7%; Miranda et al. (2000), 13%, em Vitória -Espírito Santo; Codes et al. (2002) 11,4%, na Bahia, Frias et al. (2001), em Teresópolis-RJ, encontraram positividade para *C. trachomatis* em 5% da amostra analisada.

A amostra citológica pela técnica de Papanicolaou mostrou presença de componente celular endocervical e/ou da zona de transformação (células metaplásicas) em 83,6%, das pacientes estudadas, estando incluídas neste percentual todas as pacientes com positividade para *C. trachomatis* 6/171, pelos diferentes métodos laboratoriais utilizados. Sendo, então, observado que não necessariamente tendo uma amostra representativa, pode-se constatar características citológicas sugestivas da infecção por *C. trachomatis*, mesmo sendo positiva em outra técnica laboratorial.

No entanto, um dado importante que deve ser levado em consideração na análise citológica durante investigação de infecção por *Chlamydia*, segundo Shirata et al. (1992) e Cavaliere et al. (1989), seria a presença de células endocervicais e/ou metaplásicas. Já Stinghen; Nascimento e Leonart (2004) citam que um diagnóstico confiável está diretamente associado a uma coleta representativa da região infectada; no caso de cervicites, a região endocervical. Gupta et al. (1979), assim como Borges e Vera (1986) evidenciaram a *C. trachomatis* nos esfregaços cervicais através da observação de inclusões no citoplasma das células metaplásicas pavimentosas e colunares endocervicais.

Caudill *et al.* (1994); Geeling *et al.* (1975); Pandit *et al.* (1992) não aprovam a eficiência da citologia no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. No entanto, outros mostram uma boa aceitação desta técnica.

No presente estudo, os efeitos citopáticos sugestivos de infecção por *C. trachomatis* foram identificados em 1/171 (0,6%) das pacientes pelo método de Papanicolaou, e em 6/171 (3,5%), por IFD. Stinghen, Nascimento e Leonart (2004) detectaram 3,6% de positividade para *C. trachomatis*, utilizando a IFD e 1,4% com o método de Papanicolaou. Cavaliere *et al.* (1989) obtiveram 6,8% de amostras positivas no exame citológico e 20,5% por IFD.

Rantala e Kivinen (1998) observaram que 27% da amostra com alterações inflamatórias e 2,4% da amostra sem alterações inflamatórias foram positivas para *C. trachomatis* na IFD. Nossos achados mostram que toda amostra que foi positiva para *C. trachomatis* na IFD, apresentou alterações celulares benignas na citologia cérvico-vaginal, sendo na maioria reativas associadas à inflamação. No entanto, todas as pacientes positivas na IFD, no exame citológico mostraram: cocos e bacilos em 3/6 (50%), cocobacilos sugestivo de *Gardnerella vaginalis* 2/6 (33,3%) e 1/6 (16,7%) bacilos e *Cândida* spp.

Nos nossos achados, nenhuma paciente com presença de *C. trachomatis* apresentava lesões pré-neoplásicas com ou sem infecção pelo HPV. No entanto, Smith, *et al.* (2002) observaram a possível associação da *C. trachomatis* como co-fator do HPV na etiologia do câncer escamoso cervical.

O diagnóstico da *Chlamydia* spp. não está citado em Solomon e Nayar (2005), porque existe uma baixa eficácia diagnóstica na rotina citológica para este organismo. Nós usamos critérios propostos por Gupta *et al.* (1988) e nossos achados sugeriram que a infecção por *C. trachomatis* ocorreu em apenas 1/171

(0,6%), sendo o mesmo confirmado através da IFD. No entanto, os 5/6 (3,0%) diagnosticados positivos para *C. trachomatis* apenas por IFD não demonstraram nenhum critério sugestivo da infecção na citologia. Todavia, Gupta *et al.* (1979) evidenciaram que o estágio final da infecção por *Chlamydia* seria identificado pela presença de inclusões intracitoplasmáticas com bordos definidos, moldagem, elevação e formação de *target* central. Podemos, então, defender que existe certa influência do estágio da infecção na detecção da *C. trachomatis* utilizando o método citológico. Observamos, com isso, que na IFD não existe esta influência, portanto existe a vantagem de ser um diagnóstico mais precoce, bastando apenas que haja a presença ativa da bactéria e seus antígenos.

Pánuco *et al.* (2000) encontraram quatro casos (3,2%) sugestivos de *C. trachomatis*, sendo três confirmados por IFD e PCR.

Mejia *et al.* (1989); RADDI e SOARES (1994) observaram a sensibilidade e a especificidade para o Papanicolaou em torno de 27% e 80%, respectivamente. Nas proximidades desses percentuais, encontram-se nossos achados, os quais evidenciaram 16,6% e 100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente.

Vinette-Leduc *et al.* (1997) evidenciaram que a citologia e a ELISA, quando comparadas com a técnica de PCR, seriam insensíveis. Em contrapartida, quando Pánuco *et al.* (2000) comparam a técnica de Papanicolaou com outros diagnósticos mais sensíveis e específicos como PCR e ELISA, observaram que a mesma apresenta sensibilidade 100% e especificidade 99,18%. No entanto, vale salientar que PCR ainda é impossível de constituir um exame de rotina nos serviços brasileiros.

A citologia pode contribuir na detecção da infecção por *Chlamydia*, porém faltam fatores para aumentar sua sensibilidade, embora, demonstre boa especificidade.

Apesar das diversas controvérsias observadas entre as técnicas, foi possível evidenciar que a técnica de Papanicolaou, desde que seja realizada com amostra adequada, ou seja, com representação celular satisfatória e criteriosamente analisada, pode ser considerada como diagnóstico eficaz na detecção da *C. trachomatis*.

Nossos achados sugerem que a citologia (técnica de Papanicolaou) pode contribuir para o diagnóstico da infecção por *Chlamydia*, entretanto não deve ser considerada uma técnica diagnóstica única conclusiva. Assim como é utilizada na triagem para detecção do câncer cervical, pode ser relevante na triagem, em serviços públicos de saúde, sugerindo um rastreio mais definido de DST, considerando em especial a *Chlamydia trachomatis*.

Por fim, ressalte-se ser necessário ampliar e aprimorar estudos, confirmando achados citológicos utilizando IFD ou outras técnicas num universo maior de amostras.

7 CONCLUSÃO

- ❖ É possível identificar *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cérvico-vaginal de acordo com critérios definidos por Gupta *et al.* (1988),
- ❖ A IFD, utilizando material endocervical, deveria continuar sendo utilizada na detecção de casos de infecção por *Chlamydia*, com critério, e se possível, disponibilizada em maior escala nos serviços públicos, objetivando atender não só a demanda de pacientes sintomáticas, mas a toda a população de vida sexual ativa.
- ❖ Na amostra estudada concluiu-se que comparando, a técnica de Papanicolaou com a imunofluorescência direta, a sensibilidade e a especificidade da citologia foi de 16,6% e 100% respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A. A. F.; FERREIRA, L. C. L.; LOUREIRO, J. A. S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **J. Bras. Ginecol**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 6, p.199-203, 1993.

ANGELES, R. *et al* Contribución al estudio de la prevalencia de la infección por *Chlamydia* en parejas con infertilidad. **Ginecol. Obstet. Mex**, México, v. 45, n.3, p.167-171, 1999.

BARBERIS, I. *et al*. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por enzimo inmunoensayo con anticuerpos monoclonales en mujeres sexualmente activas. **AC. trachomatosa Bioquím. Clin. Latinoam**, Buenos Aires, v. 31. n. 2. p. 183-187, 1997.

BARNES, R C.: Laboratory Diagnosis of human *Chlamydia* infections. **Clin. Microb. Rev**, Washington, v. 2, p.119-136, 1989.

BIO-RAD LABORATORIES. **Pathfinder Chlamydia trachomatis direct specimen, 30704**. California, 2003.

BORGES, R. J.; VERA, I. Correlation between clinicol and morphologic aspects of gynecologic infections by *Chlamydia trachomatis* trate with tibioties. **Acta. Cytol**, St. Louis, v. 30, n. 5, p. 558, 1986.

BRUNHAM, R. C. *et al*. Correlation of host immune response with quantitative recovery of *Chlamydia trachomatis* from the endocervix. **Infect. immun**, Washington, v. 39. p. 1491-1494. 1983.

CAMPOS, E. P. As Chlamydias. **Patologista**, São Paulo, v. 5, n. 25, p. 6, 1986

CATES, J.; WASSERHEIT, J.N.; MARCHBANTES, P. A. 'Pelvic Iflammatory Disease & Tubal Infertility: The preventable ditions', **Ann. N Y Acad. Sci**, New York, v. 709, p.179-185, 1994.

CAUDILL, J. L.; HUMPHREY, S. K.; GOELLNER, J. R. Cervicovaginal Cytology and the Diagnosis of *Chlamydia trachomatis*: A Comparison With Immunofluorescent Results. **Diagn cytopathol**, New York, v. 1, n. 1, p. 20-22, 1994.

CAVALIERE, M.J. *et al*. *Chlamydia trachomatis*: importância da colheita endocervical no diagnóstico pelo método de Papanicolaou. **Rev. Paul. Med, São Paulo**, v. 107, n. 1, p.25-28, 1989.

CODES, J. S. *et al*. Detecção de Doenças Sexualmente Transmissíveis em Clínica de Planejamento Familiar da Rede Pública no Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 101-106, mar. 2002.

DE PALO, G. Inflamação Granulomatosa. In: _____. **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1996. p.106-108.

DE PALO,G; CHANEN,W; DEXEUS,S. Doenças da Vulva. In: _____. **Patologia e tratamento do trato genital inferior**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. p. 94-195.

FRIAS, M. C. A. A., *et al.* Freqüência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma Urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na Endocérvice de Mulheres no Menacme. **DST J. Brás. Doenças Sex. Transm**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 5-22, 2001.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: _____. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996. p. 1-6.

GARCIA, E.; GUADALUPE DE LOS A. Biología molecular e implicaciones clínicas Del género *Chlamydia*. **Infect**, México, v. 7, n.12, p.581-590, 1987.

GAROZZO, G. *et al.* *Chlamydia trachomatis* diagnosis: a correlative study of pap smear and direct immunofluorescence. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol**, Padova, v. 20, n. 4, p. 259-263, 1993.

GEELING, S. *et al.* Sensitivity and specificity of the Papanicolaou stained cervical smear in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. **Acta Cytol**, St Louis, v. 29, n. 5, p. 671, 1975.

GUERRA, I. F. M. Evaluación de la sensibilidad y especificidad, de três reactivos de imunofluorescencia directa para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. **Ginec Obst. Mex**, México, v. 63, p. 368-373, 1995.

GUPTA, P.K. *et al.* Cytologic investigations in *Chlamydia* infection. **Acta Cytol**, St. Louis, v. 23, p.315-320, 1979.

GUPTA, P. K. *et al.* Cytopathologic detection of *Chlamydia trachomatis* in vaginopancervical (Fast) smears. **Diagn. cytopathol**, New York, v. 4. n. 3. p. 224-229,1988.

MAEDA, M.Y; S. *et al.* Detection of *Chlamydia trachomatis* cervical infection: a comparison of Papanicolaou and immunofluorescent staining in smears obtained by Aure's spatula and eytobrush. **Pathologica**, Pisa, v. 83, p.105, 1991.

MARTINEZ, T. *et al.* Comparación de la inmunofluorescencia, ensayo inmunoluzimático e cultivo celular para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* em infecciones urogenitales. **Ver. Med. Chil**, Santiago, v. 119, n.2, p.164-168, 1991.

MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. **Atlas de diagnóstico em microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 12, p.102-106.

MEJIA, R. M. S.; *et al.* Detección de infección endocervical por *Chlamydia* comparando la tinción de Papanicolaou con inmunofluorescencia direta. **Ginecol. Obste. Mex**, México, v. 57, n. 2, p.29-36, 1989.

MELLES, H. H. B; *et al.* Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela *Chlamydia trachomatis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2000.

MIRANDA, A. E. *et al.* Sexually transmitted diseases among female prisoner in brazil: prevalence and risk factors. **Sex. Transm Dis.**, v. 27. n. 9. p. 491-495,2000.

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

NAUD, P. S. U. Cervicites e Uretrites. In: _____. **DST/AIDS: Manual de Orientação**. São Paulo: Ponto, 2004. cap. 6, p. 59-63.

PANDIT A. A.; *et al.* Value of Papanicolaou Smear in Detection os *Chlamydia trachomatis* Infection. **Diagn. Cytopathol**, New York, v. 9, n. 2, p.164-167, jun. 1992.

PÁNUCO, C.A.B.; *et al.* E.R. Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. **Acta Cytol**, St. Louis MO, v. 44, n.2, p.114-123, 2000.

RADDI, M. S. G.; SOARES, C. P. Comparação do Papanicolaou e cultura em células para diagnóstico de infecções cervicais causadas por *Chlamydia trachomatis*. **Rev. Bras. Anal**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p.117-121, 1994.

RAVEL, R. **Laboratório clínico**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1997. p.180-182.

RANTALA, I; KIVINEN, S. Demonstration of *Chlamydia trachomatis* in Papanicolaou Stained Gynecological Smears. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Finland,v. 17, p. 46-48, 1998.

REYES-MALDONADO, E; *et al.* Detection of *Chlamydia trachomatis* by Immunofluorescence, Papanicolaou and Immunoperoxidase in Women with Leucorrhea. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, México, v. 38, p. 65-73, 1996.

SEADI, C. F. *et al.* Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p.125-133, 2002.

SHARMA, K; AGGARWAL, A; ARORA, U. Seroprevalence of *Chlamydia trachomatis* in women with bad obstetric history and infertility. **Indian J. Med. Sci.**, Bombay, v. 56, n. 5, p. 216-217, 2002.

SHIINA, Y. Cytomorphologic and immunocytochemical studies of Chlamydial infections in cervical smears. **Acta Cytol**, St. Louis, v. 29. p. 683. 1985.

SHIRATA, N. K. *et al.* Utilidade do uso combinado de colheita com cytobrush e espátula de Ayre para o exame citológico cérvico-vaginal. **J. Bras. Ginecol**, São Paulo, v. 102, n. 1, p.15-18, 1992.

SHURBAJI, M. S.; GUPTA, P. K.; MYRES, J. D. Immunohistochemical demonstrations of *Chlamydia* antigens in association with prostatitis. **Mod. Pathol**, Baltimore, v.1, p.348, 1988.

SILVA, C. H. P. M. *Chlamydia, Mycoplasma e Rickettsia*. In: _____. **Bacteriologia: um texto ilustrado**, Rio de Janeiro, Eventos, 1999. cap. 21, p. 317-328.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO-FILHO, A. *Chlamydias*. In: _____. **Colo uterino e vagina: processo inflamatório**. Rio de Janeiro, Revinter, 2000. p. 111-122.

SMITH, J. S. *et al.* Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a Human Papillomavirus Cofactor in the etiology of Invasive Cervical Cancer in Brazil and the Philippines. **The J. Infect. Dis.**, Tokyo, v. 185, p. 324-331, 2002.

S.O.S. CORPO. GÊNERO E CIDADANIA. **Atualização da Padronização de normas e procedimentos para a prevenção do câncer de colo uterino no Estado de Pernambuco**. Recife, 1998.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal: Definições, critérios e notas explicativas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

STAMM, W. E. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitorinay infections. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.108, p.710-717, 1988.

STINGHEN, A. E. M.; NASCIMENTO A. J.; LEONART, M.S.S. Método de papanicolaou em material cérvico-vaginal para a triagem de infecção por *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 111-115, 2004.

THEJLS, H. *et al.* Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology. **Genitourin Med**, London, v. 70, p. 300-303, 1994.

VARELLA, *et al.* Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* em mulheres do município de Pirai- Rio de Janeiro **DST J. Bras. Doenças Sex. Transm**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p.27-44, 2000.

VERA, I; *et al.* Estúdio Clínico morfológico em lãs infecciones ginecológicas por *Chlamydia trachomatis*. **Ver. Obstet. Ginecol**, v.46, n.4, p.165-167, 1986.

VINETTE-LEDUC, D.;*et al.* Reliability of cytology to detect *Chlamydial* infection in asymptomatic women. **Diagn. cytopathol**, New York, v. 17, n. 4, p.258-261, 1997.

WARD, M.E. The immunobiology and immunopathology of Chlamydial infections. **APMIS**, Copenhagen, v. 103, p. 769, 1995.

ANEXOS

ANEXO A

Recife, 01 de junho de 2004.

**PRÓ-REITORIA DE PÓS – GRADUAÇÃO E PESQUISA
GERÊNCIA DE PROJETOS DE PESQUISA**

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UPE

O Comitê em reunião do dia 31/05/04, considerou **APROVADO**, o Projeto de pesquisa de Nº 069/04, intitulado:

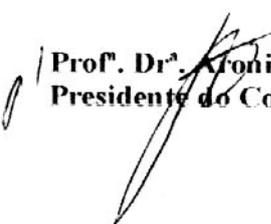
**COMPARAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E IMUNOLÓGICO NAS
INFECÇÕES CERVICO VAGINAL CAUSADAS POR CHLAMYDIA
TRACHOMATIS**, que tem como pesquisador principal:

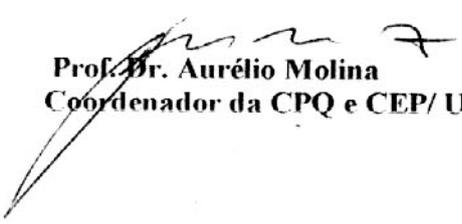
Prof.: **CARLOS EDUARDO DE QUEIROZ LIMA**

RESUMO DO COMITÊ DE ÉTICA

O estudo não apresenta riscos de agravos Éticos e está em consonância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, com a Declaração do Helsinque e com o Código de Nuremberg para a experimentação humana.

Atenciosamente,


Prof. Dr.^a **Tonita Rosenblatt**
Presidente do Comitê de Ética da UPE


Prof. Dr. **Aurélio Molina**
Coordenador da CPQ e CEP/ UPE

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____

Permito minha admissão no Ambulatório do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM).

Em consequência, permito ser submetido à rotina de investigação para os procedimentos diagnósticos indicados para esse objetivo, tais como exames laboratoriais (coleta de material cérvico-vaginal).

Antes de minha participação neste ambulatório, o profissional envolvido na investigação, me dará informações adicionais que eu julgar necessárias para meu melhor entendimento quando então, solicitará meu consentimento para os procedimentos relacionados à investigação.

Na dependência do (s) resultado(s) obtido (s) através de exame laboratorial, receberei um encaminhamento para setor específico, nesse serviço, onde receberei acompanhamento médico e/ou tratamento adequado se necessário.

Autorizo a utilização destas informações obtidas de minha pessoa, em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade.

Esse "Termo de Consentimento" me foi totalmente explicado e eu entendi seu conteúdo.

Finalmente, estou ciente de que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer penalização.

Este documento foi confeccionado em duas vias ficando uma via em minha posse e a outra em posse dessa instituição.

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa

Ass. _____

Nome da Paciente

Ass. _____

1a. Testemunha

Ass. _____

2a. Testemunha

Ass. _____

ANEXO C

CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nº Prontuário

____ - ____

Nome

Data de Nascimento

____ / ____ / _____

Idade

Endereço

Número

Bairro

UF

Município

CEP

____ - _____

Telefone

____ - _____

INFORMAÇÕES DA COLETA

Citologia Anterior

Sim

Normal (Negativo Inflamatório)

Anormal (NIC ou Carcinoma)

Não

Ignorado

Informações Clínicas

DIU

Gestante

Hormonioterapia

Radioterapia Pélvica

Outras Informações

DUM

____ / ____ / _____

Inspeção do Colo

Presente

Sem Tumor Evidente

Com Aspecto Tumoral

Ausente

Não Visto

Sintomas () sim () não

Há quanto tempo

Até 3 Anos

De 3 a 5 Anos

Acima de 5 Anos

Ignorado

Data da coleta

____ / ____ / _____