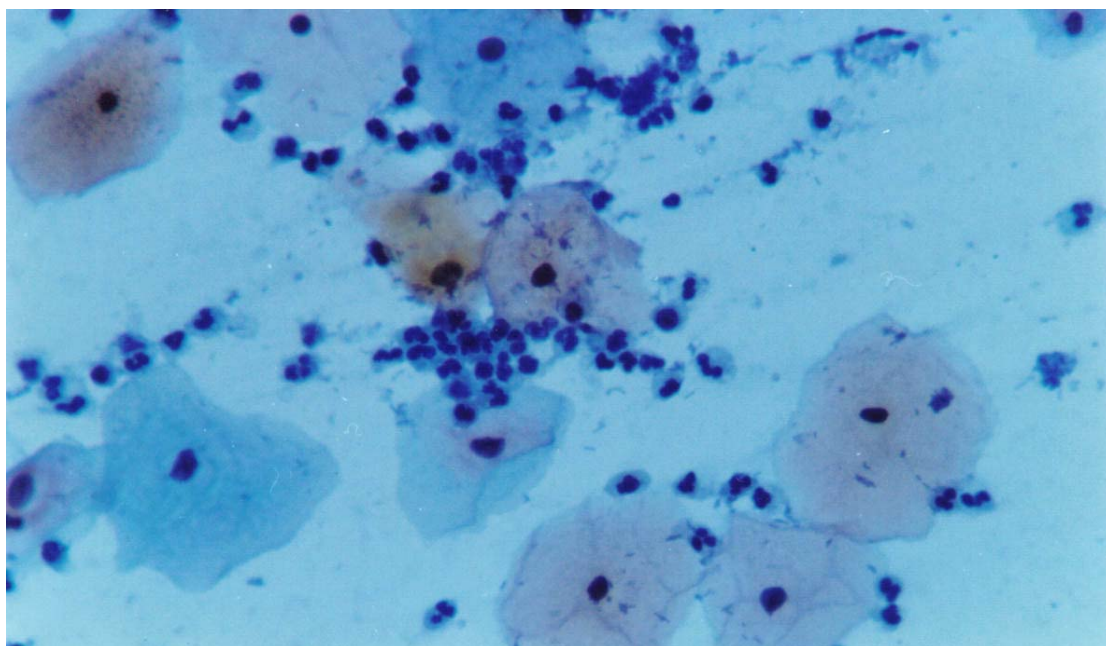


MARIA DO PERPETUO SOCORRO SILVA

**ALCANCES E LIMITES DO EXAME CITOPATOLÓGICO
COM A COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU
NO DIAGNÓSTICO DAS CÉRVICO-VAGINITES:
um estudo citológico e microbiológico de 2.169 casos
de um total de 10.064 exames citopatológicos**



**RECIFE
2004**

MARIA DO PERPETUO SOCORRO SILVA

**ALCANCES E LIMITES DO EXAME CITOPATOLÓGICO
COM A COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU
NO DIAGNÓSTICO DAS CÉRVICO-VAGINITES**

**RECIFE
2004**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-reitor

Prof. Gilson Edmor Gonçalves e Silva

Pró-reitor para assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Celso Pinto Melo

Centro de Ciências da Saúde

Diretor

Prof. José Thadeu Pinheiro

Hospital das Clínicas

Diretora

Prof^a. Heloísa Mendonça de Moraes

Departamento de Patologia

Chefe

Prof^a. Ana Virgínia Guendler

Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica

Coordenador

Prof. Roberto José Vieira de Mello

Vice- Coordenadora

Prof^a. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

MARIA DO PERPETUO SOCORRO SILVA

**ALCANCES E LIMITES DO EXAME CITOPATOLÓGICO
COM A COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU
NO DIAGNÓSTICO DAS CÉRVICO-VAGINITES**
um estudo citológico e microbiológico de 2.169 casos
de um total de 10.064 exames citopatológicos.

Tese que apresenta ao Programa de
Pós-Graduação em Anatomia
Patológica do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título
de Mestre em Anatomia Patológica.

ORIENTADORA

PROF. DRA. MARIA DO CARMO CARVALHO DE ABREU E LIMA

SILVA, Maria do Perpetuo Socorro

Alcances e limites do exame citopatológico com coloração de Papanicolaou
no diagnóstico das cérvico-vaginites. Um estudo citológico e microbiológico de
2169 casos de um total de 10.064 exames citopatológicos.
189 folhas:il. tab.,graf.,fotos

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Anatomia
Patológica,2004

Inclui referências bibliográficas.

1. Esfregaço cérvico-vaginal. 2.Cérvico-vaginites. 3. Doenças sexualmente
transmissíveis do trato genital feminino.4. Coloração de Papanicolaou. I. Título.

UFPE

" A Ciência, por exemplo, é boa?

- Boa , má ou indiferente, conforme o modo de professá-la e o uso que se faz dela. Boa, má ou indiferente, em primeiro lugar, para os próprios cientistas, do mesmo modo que a arte e a erudição podem ser boas, más ou indiferentes para os artistas e os eruditos. Boa, se facilita a libertação; indiferente se nem facilita nem dificulta...."

Aldous Huxley

DEDICATÓRIA

In memoriam:

À minha mãe Maria Helena, com quem aprendi
muitas lições, a maior delas - a fé em Deus.

Ao meu pai, Paulo, por seus momentos de coragem e
ética na sua vida de funcionário público.

AGRADECIMENTOS

À UFPE que me acolheu como pós-graduanda, compreendendo que a trajetória dos nordestinos pelas terras brasileiras deve trazer benefícios para a nossa região e para o país.

À Prof. Dra. Maria do Carmo Carvalho Abreu e Lima e Prof. Dayse N.O. Lima, pela habilidade e sinceridade com me receberam em Recife. A formação científica sólida de Maria do Carmo foi fundamental para definir o perfil definitivo deste trabalho.

À equipe do Laboratório Sabin de Patologia Clínica de Maceió, especialmente à Dra. Denise Almeida Bandeira, principal responsável pelos exames microbiológicos e ao Dr. Denis S. Casado Valente de Lima, pela sua capacidade de organização e operosidade.

À Prof. Dra. Dinalva Bezerra da Rocha ex-professora de Patologia da FMUFAL e da FM de Alagoas, por ter sabido tão bem me conduzir pela mão, nesta caminhada.

Ao Dr. Carlos Marigo que me iniciou em pesquisa mostrando detalhes de biópsias e autópsias ou acompanhando os primeiros trabalhos científicos para congressos e, por isso, é o primeiro da lista dos caros professores da Santa Casa de São Paulo e da FMUSP que contribuíram para a minha formação como patologista.

Ao meu filho Eduardo Henrique, que me compreendeu nas horas de estudo e me chamou logo a atenção de que o nome dos microorganismos deve ser escrito em *itálico*.

Ao Dr. Fernando Silva Caldas, Ana Gisa e Dra. Amanda D. Silva Caldas, amigos e profissionais competentes.

Ao Dr. Mário Velloni, Citopatologista experiente, Patologista e ex- Chefe da disciplina de Anatomia Patológica na FM de Santo Amaro. Velloni é um amigo, um exemplo de força de trabalho, com humanismo e retidão, sem perder o senso de humor.

À Dra. Valéria Hora de Melo, que implementou a prevenção do câncer ginecológico com o exame citopatológico em Maceió e outras localidades de Alagoas, e se fez presente nos momentos necessários desta caminhada.

À equipe da Biblioteca da UFAL, especialmente Maria Bernadete Pedrosa Pereira, amiga dos tempos de colégio, pela ajuda valiosa que facilitou a pesquisa bibliográfica, além da pontualidade na obtenção das referências. A mesma valiosa ajuda recebi de Leandra Elon da Silva, da Biossintética Assistance.

Aos professores de Língua Inglesa pelo conhecimento que me facilitou entender a metodologia científica, comentários e conclusões da maioria dos trabalhos da literatura consultada.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Bezerra e Maria Lusia de Moraes pelo apoio com a computação dos dados, situando-nos com relação ao teor da amostra e estimativa dos dados gerais, no início deste trabalho .

Ao Prof. Dr. Adonis de Carvalho pelo estímulo e colaboração com os cálculos estatísticos.

Às pacientes que fazem parte da amostra, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho. Com uma pesquisa, não somente ensinamos mas também aprendemos e, por isso, constatei que há necessidade de que as mulheres tenham uma assistência

médica mais completa, para que desempenhem os seus múltiplos papéis na sociedade atual com uma melhor qualidade de vida..

Aos companheiros de trabalho, professores e funcionários, do Departamento de Patologia da FM - UNCISAL (antiga ECM), com os quais enfrentamos e superamos tantas dificuldades, sem dispensar as confraternizações dos finais de ano.

Aos alunos e ex-alunos - são tantos, e quando os encontro, perceber o que construímos juntos, renova a minha esperança de que dias melhores virão.

À minha turma de Residentes da Santa Casa de São Paulo, especialmente a Dra. Consuelo Antunes Barreto Lins, que se destacou desde o primeiro ano pelos conhecimentos que trazia de Pernambuco e por sua consideração e estima pelos colegas e amigos.

Aos meus examinadores, esperando corresponder à expectativa que os senhores merecem.

Aos familiares e a todos que direta ou indiretamente contribuem para elevar os meus passos no caminho da vida ou me seguram nos tropeços.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGUS - *Atypical glandular cells of undetermined significance*

AHO - Anticoncepcional hormonal oral

AIDS (SIDA) - Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMP - Adenosina monofosfato

ASCUS - *Atypical squamous cells of undetermined significance*

ATP - Adenosina trifosfato

BCC - *benign cellular changes*

BV (VB) - *Bacterial vaginosis* (Vaginose bacteriana)

C3 - Fração 3 do complemento

CD - grupamento (*cluster*) de diferenciação

Cl - cloro

CLIA 88 - Clinical Laboratory Improvment Act

CO₂ - gás carbônico

C V V - *Candida vulvo-vaginitis* (Vulvo-vaginite por Candida)

DIP - doença inflamatória pélvica

DIU - dispositivo intra-uterino

DNA - ácido desoxirribonucleico

DST (STD) - doença sexualmente transmissível (*sexually transmted disease*)

EI - inclusão eosinofílica intracelular (por clamídia)

ELISA - EIA- *enzyme-linked immunoabsorbent assay*

EUA - Estados Unidos da América

F1 a F11- códigos de floras para exame citológico cérvico-vaginal, adotado em 1976

Fc - fragmento cristalizável de anticorpo

GCTF - formação de alvo central granular (por clamídia)

H - hidrogênio

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HCO₂ - ácido carbônico

HCTF - formação com alvo central homogêneo (por clamídia)

HI - inclusão hematoxilínofílica intracelular (por clamídia)

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HLA - antígeno leucocitário de histocompatibilidade

HPV - papiloma vírus humano

HSV - herpes vírus *hominis* (ou herpes simplex virus)

HSIL ou HGSIL - *high grade squamous intra-epithelial lesion* (lesão de alto grau)

IAC - International Academy of Cythology

IgG, IgM, IgE - imunoglobulinas

IF (DFA) - imunofluorescência direta

IL - interleucina

INF (IFN) - interferon

K - potássio

KOH - hidróxido de potássio

L - linfócito

LB - linfócito B (bursa), da imunidade humoral

LCR - *light chain reaction*

LSIL ou LGSIL - *low grade squamous intra-epithelial lesion* (lesão de baixo grau)

LT - linfócito T (timo), da imunidade celular

LTh - linfócito T-helper (linfócito T-auxiliar)

ME - microscopia eletrônica

MPC - *mucopurulent cervicitis* (cervicite muco-purulenta)

Na - sódio

NaCl - cloreto de sódio

NI - inclusão nebular (por clamídia)

NIC - neoplasia intra-epitelial cervical

NSV - *non-specific vaginitis* (vaginite bacteriana inespecífica)

O₂ - oxigênio

OMS (WHO) - Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

PAS - periodic acid Schiff

PCR - *polimerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PGE - prostaglandina E

PH - potencial hidrogênio-iônico

PMN - polimorfonuclear neutrófilo

PPLO - *pleuropneumonia-like organisms*

RN - recém-nascido

RNA - ácido ribonucleico

RVVC - infecção vaginal recorrente por *Candida*

SARA - artrite reativa sexualmente adquirida

SIL - *squamous intraepithelial lesion*

SUS - Sistema Único de Saúde

TBS - The Bethesda System (Sistema Bethesda)

TCR - receptor de célula T

TRIC - *trachoma-inclusion conjunctivitis*

T+ M - exame bacterioscópico positivo e negativo para tricomonas e / ou monília

UNG (NGU) - uretrite não gonocócica (*non-gonococic urethritis*)

Zn- zinco

RESUMO

O impacto do exame citológico cérvico-vaginal de Papanicolaou na redução das taxas de carcinoma escamocelular invasor obscureceu o papel desse exame no diagnóstico das cérvico-vaginites, com reflexos sobre o Sistema Bethesda (TBS). Os aperfeiçoamentos do TBS no terreno das lesões intra-epiteliais escamosas não foram alcançados no que diz respeito às infecções, apesar dos avanços da pesquisa microbiológica.

A autora estudou, a partir de uma amostra de 10.064 exames citopatológicos, dos quais 86% apresentavam inflamação (12,34 % leve, 66,22% moderada e 7,44% intensa), 2169 casos em que foram solicitados exames microbiológicos a critério clínico. O exame microbiológico, representado pela cultura em 94,85% dos casos, revelou frequência relativa semelhante entre os três tipos de floras mais encontradas no exame citopatológico e microbiológico ($p < 0,001$): as de *Lactobacillus* sp., *Candida* sp., e *Gardnerella vaginalis*, esta última diagnosticada pela ocorrência de “célula-guia”.

Confirmou-se a possibilidade de diagnóstico citológico pelo método de Papanicolaou, dos *Lactobacillus* sp., *Candida* sp., *Leptotrix vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*. O diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* é seguro, quando se identifica a “célula guia”. São ainda diagnosticáveis o *Actinomyces* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus* sp. e provavelmente, *Mobiluncus* spp. Confirmamos que a codificação das floras F1 a F11 não deve ser utilizada. Como consequência do estudo, propomos as seguintes modificações no sub-ítem “Infecções” do TBS, em relação às especificações dos microorganismos:

- 1) Manutenção do item *Lactobacillus* sp.
 - 2) Substituição de “Alteração da flora vaginal compatível com vaginose” por “*Gardnerella vaginalis* com presença de célula-guia”
 - 3) Inclusão do tópico “Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico”.
- Esta última observação permitirá ao citopatologista, comunicar ao clínico, a necessidade de investigar os casos suspeitos de infecção ao exame citológico,

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO.....	XIII
1.0 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - RESUMO HISTÓRICO	2
1.2 - O INTERESSE DOS MICROBIOLOGISTAS NO POTENCIAL DA CITOPATOLOGIA EM DIAGNOSTICAR INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO GENITAL NA MULHER.....	10
1.3 - O ECOSISTEMA VAGINAL.....	14
1.3.1 - O desenvolvimento do conhecimento sobre a microflora vaginal.....	15
1.3.2 - As características da microflora e do ecossistema vaginal.....	15
1.3.3 - O habitat da microflora.....	17
1.3.4 - As bactérias que compõem a microflora.....	20
1.3.5 - As espécies de <i>Lactobacillus</i> da microflora, protetoras do ecossistema.....	21
1.3.6 - Os fatores do hospedeiro que influenciam a microflora vaginal durante a vida.....	23
1.3.7 - Os fatores exógenos que desequilibram o ecossistema vaginal.....	23
1.4 - A VAGINOSE BACTERIANA (BACTERIAL VAGINOSIS).....	24
1.4.1 - As descobertas após a pesquisa de Gardner e Dukes e o teste do KOH.....	26
1.4.2 - A identificação das bactérias anaeróbicas associadas à <i>Gardnerella vaginalis</i>	27
1.4.3 - A produção de aminas na BV.....	29
1.4.4 - Os "critérios de Amsel" para o diagnóstico da BV.....	29
1.4.5 - A denominação Vaginose bacteriana e as conclusões de Spiegel.....	31
1.4.6 - <i>Mobiluncus sp.</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> incluídos como flora patogênica da BV....	32
1.4.7- A ausência de leucócitos característica da BV.....	34
1.4.8 - As complicações da BV.....	35
1.4.9 - Principais conclusões sobre a BV que se aplicam ao seu diagnóstico com o exame citológico.....	36

1.5 - OS MICOPLASMAS GENITAIS.....	37
1.5.1 - Os achados do exame citológico na presença de micoplasmas genitais.....	38
1.5.2 - Principais características dos micoplasmas.....	40
1.5.3 - Os micoplasmas patogênicos mais frequentes no homem.....	41
1.5.4 - A exacerbação dos micoplasmas genitais e as características da infecção.....	42
1.5.5 - Possíveis complicações da infecção por micoplasmas genitais.....	44
1.5.6 - As doenças infecciosas comprovadamente causadas por micoplasmas genitais..	46
1.6 - A INFECÇÃO VAGINAL E CERVICAL POR TRICHOMONAS VAGINALIS.....	46
1.6.1 - Alguns dados sobre a patogenicidade da <i>Trichomonas vaginalis</i>	48
1.6.2 - Características histopatológicas da infecção cervical por <i>T.vaginalis</i>	49
1.6.3 - Características citológicas da infecção por <i>T. Vaginalis</i>	50
1.7 - A VAGINITE POR CANDIDA E OS ESTUDOS DA IMUNOLOGIA DA VAGINA.....	52
1.7.1 - As formas clínicas da infecção e as espécies de cândida isoladas.....	52
1.7.2 - O desenvolvimento do fungo e a transformação da colonização em doença.....	52
1.7.3 - Fundamentos básicos de imunologia da vagina e a contagem de leucócitos.....	56
1.7.4 - A imunidade humoral na cérvix e vagina.....	58
1.7.5 - A imunidade celular na defesa do hospedeiro na vagina.....	59
1.7.6 - A relação entre a imunidade celular e o ciclo hormonal.....	64
1.8 - O ACHADO DE CLAMÍDIA NO ESFREGAÇO CÉRVICO-VAGINA.:	65
1.8.1 - Principais características da clamídia e do seu ciclo reprodutivo.....	65
1.8.2 - Os achados do exame citológico na infecção por clamídia.....	66
1.8.3 - A infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> suas formas clínicas, imunobiologia e a pesquisa de uma vacina.....	68
1.8.4 - Os métodos de diagnóstico da infecção genital por clamídia.....	71
1.9 - O SISTEMA BETHESDA (TBS).....	72
2.0 – OBJETIVOS.....	80
3.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	82

3.1 - Material:.....	82
3.1.1 - Material para exame citológico.....	82
3.1.2 - Material para exame microbiológico.....	82
3.2 - Método:.....	83
3.2.1 - Obtenção e processamento do material para exame citológico.....	83
3.2.2 - Obtenção e processamento do material para exame microbiológico.....	84
3.3 - Avaliação da flora (F) ao exame citológico.....	86
3.4 - Avaliação da intensidade da inflamação ao exame citológico.....	88
3.5 - Estudo estatístico.....	89
4.0 – RESULTADOS.....	91
4.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA (10.064 CASOS).....	91
4.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS FLORAS MAIS COMUNS.....	96
4.3 - ANÁLISE DOS CASOS SUBMETIDOS A EXAME CITOPATOLÓGICO E MICROBIOLÓGICO – (2.169 CASOS).....	99
4.4 - FOTOMICROGRAFIAS DE ALGUNS CASOS ESTUDADOS.....	113
5.0 – DISCUSSÃO.....	121
5.1 - A avaliação das amostras e a prevalência de inflamação nos exames de citologia cérvico – vaginal.....	121
5.2 – Principais observações sobre a prevalência dos agentes identificados com o exame de citologia cérvico-vaginal e exame microbiológico.....	124
5.3 - O conhecimento do ecossistema vaginal aplicado à presença de <i>Lactobacillus</i> no esfregaço.....	125
5.4 - A interpretação da flora bacteriana patogênci na ausência de <i>Lactobacillus</i>	129
5.5 - Os estudos da BV e sua correlação com o exame citológico.....	132
5.6 - A infecção por <i>T. vaginalis</i> e o papel da Citopatologia no seu diagnóstico.....	138
5.7 - A infecção por <i>Candida sp.</i> , a mais frequente desta amostra.....	141
5.8 - A infecção por clamídia, nesta amostra.....	146

5.9 – A Citopatologia no diagnóstico da intensidade e localização das inflamações – dificuldades e possibilidades.....	149
5.10 – A infecção genital ao exame citológico e a atualização dos tópicos do laudo referentes aos agentes identificados com a coloração de Papanicolaou.....	155
6.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	162
7.0 - CONCLUSÕES.....	164
8.0 – ANEXOS.....	167
9.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
10.0 –SUMMARY.....	183

1.0 INTRODUÇÃO

1.0 – INTRODUÇÃO

O exame de Papanicolaou tem como principal objetivo a detecção das lesões pré-cancerosas do colo uterino e o câncer do trato genital inferior feminino em estágio inicial ou avançado. Como alvos secundários do exame, incluímos a identificação das alterações reativas e processos inflamatórios assim como a flora normal ou patogênica. No nosso meio, devido ao baixo poder aquisitivo da população, o teste de Papanicolaou assume um papel relevante no estudo da microbiologia vaginal, apesar de reconhecermos que não substitui os métodos microbiológicos da cultura, considerada de eleição devido a sua maior sensibilidade e especificidade diagnóstica. (2,30,69,116,126)

A abordagem das pacientes com corrimento vaginal envolve diferentes especialidades médicas compreendendo a Ginecologia, a Citopatologia e a Microbiologia. Os profissionais dessas áreas, contudo, rotineiramente, trabalham individualmente e não, como uma equipe multidisciplinar como seria o ideal. (8,9,26,30,31,110,111)

Do ponto de vista clínico, as características macroscópicas da secreção vaginal, com relação á sua consistência, cor e odor são pouco específicas para indicar a sua etiologia, com exceção daquelas resultantes das infecções por *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis*. Atualmente a Ginecologia reconhece a importância dos raspados cérvico-vaginais no diagnóstico dos processos inflamatórios e agentes microbianos. A intensidade leve, moderada ou acentuada pode ser aferida através da análise de alterações citoplasmáticas ou nucleares e podem ser seguramente identificados microorganismos tais como *Lactobacillus sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Leptotrix vaginalis*, *Actinomyces sp.*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida sp*, além das alterações citopáticas pelo papiloma vírus humano, o HPV e herpes simplex, o HSV. (4,27,38,77,110,122)

A Microbiologia, por sua vez, assegura a identificação precisa do(s) agente(s) etiológico(s) mas, no nosso estudo, observamos que são solicitadas culturas da secreção vaginal que resultam em microorganismos que podem ser identificados com a coloração

de Papanicolaou. Por outro lado, são comuns os casos sugestivos de infecção ao exame citológico sem que a cultura, ou outro exame microbiológico tenha sido solicitado, embora não tenhamos verificado se a investigação do agente etiológico nesses casos, foi solicitada a critério clínico, posteriormente. Os microbiologistas reconhecem que o diagnóstico de inflamação através do exame de Papanicolaou é mais seguro que o exame a fresco e este é um dos motivos pelos quais mantém expectativas de que seja definido o seu papel como exame complementar no diagnóstico das cérvico-vaginites habituais na prática ginecológica, favorecendo o seu tratamento adequado. (30, 63, 66, 113)

O exame citológico dos raspados cérvico-vaginais foi apresentado à comunidade científica americana em 1933 por Papanicolaou que, ao visualizar células malignas de câncer cervical, enfatizou a importância desse achado na prevenção do câncer de colo e, nas décadas seguintes, o emprego do novo método de exame resultou em redução significativa dessa neoplasia, quando o teste foi aplicado em larga escala na população. O próprio Papanicolaou apontou, no seu trabalho original, as "grandes flutuações do número de leucócitos sob diferentes condições", quantidade "também afetada pela presença de certas formas bacterianas", mas de "limitado valor diagnóstico para câncer uterino" e classificou a inflamação como da Classe II, em 1954. (64,92)

O Sistema Bethesda (TBS) em 1988 e 1991 introduziu novos termos como Alterações Celulares Benignas (BCC) que, para os especialistas norte-americanos, são "um largo espectro de processos não neoplásicos e reativos que ocorrem na cérvix e raramente associa-se com NIC ou carcinoma cervical" . No relatório do TBS 1991 e no relatório do Exame de Citopatologia Vaginal do SUS, dois tópicos constituem as Alterações Celulares Benignas: Infecções e Alterações reativas, que não devem ser substituídas apenas pela indicação "Negativo para lesão intra-epitelial ou malignidade", proposta pelo TBS 2001. (1,9,30,45,46,68,81,84,85,89,117,126)

Com este trabalho, idealizado porque o reconhecimento dos microorganismos vaginais habituais, no esfregaço citológico, foi facilitado pelo acesso aos resultados dos exames de bacterioscopia, cultura e imunofluorescência, esperamos contribuir para o aperfeiçoamento da nomenclatura da Citopatologia para as infeções cérvico-vaginais. Com a associação desses diferentes métodos de diagnóstico, acreditamos ser possível orientar melhor o ginecologista, na propedêutica das secreções patológicas cérvico-vaginais. A inesperada escassez de estudos na revisão bibliográfica, enfocando a correlação citológica com os exames convencionais microbiológicos, representou um estímulo adicional a esta pesquisa. (18,26,27,30,31,38,63,73,77,91,93,116,119,126)

1.1 - RESUMO HISTÓRICO – CITOLOGIA E CITOPATOLOGIA

“A história não deve servir apenas como fim em si, para recordar somente pessoas e acontecimentos, senão para nos ensinar e nos alertar”, (Saumann) ou “é a bússola que nos guia para o futuro” (Sigerist apud Kline). (64,99).

O conceito de célula começou a se estabelecer na Europa no século XIX, quando Schleiden e Schwann em 1848, anunciaram que a célula é a unidade básica dos seres vivos, sendo este o princípio da história da Citologia. Sua história se estabeleceu aparelhada com o microscópio e um dos centros de maior interesse é o estudo do câncer. Em 1838, Johannes Muller, fisiologista em Berlim, já publicava monografia sobre a natureza e características do câncer: afirmou que as células estavam livres, separadas umas das outras e diferenciou os carcinomas dos sarcomas; definiu também critérios microscópicos para diferenciar os tumores benignos dos malignos, embora os microscopistas da época estivessem interessados nas condições normais e nas inflamações. Ainda em meados do século XIX, Lebert demonstrou que as células malignas tinham aumento da relação núcleo-citoplasma, descreveu o polimorfismo, o aumento do núcleo e do nucléolo. (99)

Rudolf Virchow (1821-1902) tomou o conceito da célula como componente unitário de todos os sistemas vivos e o colocou no centro da Medicina, marcando o início da Patologia celular. Dentre os seus antecessores, destaca-se Bichat (1771-1802). Virchow, que junto com Reinhardt, fundou em 1847 ,em Berlim, os Arquivos de Patologia, Fisiologia e Medicina Clínica, tinha sido discípulo de Muller e declarou que seu mérito foi demonstrar que os tumores malignos estavam relacionados fisiologicamente entre si. (99)

Mesmo que a Citologia só tenha adquirido importância e difusão com Papanicolaou cem anos depois, antes - no século XIX na Europa - já eram feitos diagnósticos por meio do que hoje se conhece como citologia exfoliativa, termo introduzido por Papanicolaou. Julius Vogel, em Gottingen, 1843, foi o primeiro a fazer esse tipo de diagnóstico em abcesso do pescoço e em tumor ulcerado da mama; Bennet, em Paris, 1849, foi o primeiro que examinou líquido ascítico em um caso de neoplasia maligna de ovário; Beale, em Londres, usou secreções do trato respiratório no diagnóstico de câncer faríngeo e foi o primeiro a comparar células exfoliadas com material de autópsia. Lambl, em Praga, 1856, diagnosticou células cancerosas na urina e definiu a citologia como método de diagnóstico. Em 1886, Friedlander utiliza o método citológico porém recomenda retirar pequeno fragmento de tecido, em caso de dúvidas, o que se conhece agora como biópsia. (99)

George Nikolas Papanicolaou (1883-1962) nasceu em Kymi na Grécia, médico graduado em 1904, concluiu o Doutorado em Munique e, após a guerra dos Balcãs, quando foi encorajado por voluntários greco-romanos a emigrar para a América, onde eram promissoras as oportunidades de carreira científica, George e sua mulher e colaboradora Andromache chegaram em New York em 1913. Tinham apenas \$250, não falavam inglês e aceitaram pequenos serviços em lojas, no jornal grego Atlantis ou em restaurantes e cafés tocando violino. Após três semanas, George fez contato com o D. T.H. Morgan da Columbia University, que o encaminhou ao Dr. William Elser do New York Hospital que, por sua vez, o encaminhou para a Cornell Medical College, com o Dr

Charles Stockard, chefe do departamento de Anatomia. Em 1914, um ano após sua chegada, ambos estavam trabalhando na Cornell University. No início, Papanicolaou participou de pesquisas com porcos da Guiné junto com Stockard e recebeu permissão para fazer experiências de determinação de sexo e testar o conceito de que é determinado pelos cromossomos X e Y. Como a ovulação só podia ser determinada com o sacrifício dos animais. Papanicolaou começou a colher material com pequeno espéculo nasal, após deduzir que o ciclo ovulatório dos animais devia ser semelhante ao humano. As primeiras lâminas com material dos animais e as lâminas com material humano mostraram uma variedade de células e uma sequência de padrões citológicos nunca vistos. Em 1917, quando publicou "*The existence of a typical estrous cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes*", no American Journal of Anatomy, tendo Stockard como principal autor, deu início à Citologia Hormonal. Em 1933, publicou "*The sexual cycle in human female as revealed by vaginal smears*" no Journal of Anatomy. Esses estudos levaram à descoberta do estrógeno e de vários outros hormônios. (64,99,120)

Datam de 1923, as primeiras observações de Papanicolaou, sobre a presença de células malignas em esfregaços vaginais e os achados foram apresentados, sem êxito, em 1928, porque não havia nenhum elo de ligação entre a citologia e a patologia cirúrgica, e o diagnóstico de câncer era somente feito através da biópsia. Aureli Babes, patologista romeno, publicou, também em 1928, na Presse Medicale, seu trabalho sobre o diagnóstico de câncer com a citologia exfoliativa, mas aparentemente, um não sabia das investigações do outro. (66,99,120)

Novo projeto foi elaborado com Papanicolaou em associação com Herbert Traut, do Cornell Medical College e especializado em patologia ginecológica, que fornecia as amostras. Papanicolaou e Traut iniciaram a Citologia Oncótica Vaginal com a publicação "*The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus*" no American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1941. Essa publicação e a monografia "*Diagnosis of*

uterine cancer by vaginal smear” em 1943, despertaram o interesse dos ginecologistas e da American Cancer Society porque a taxa de mortalidade por câncer nos Estados Unidos era de 26.000 mulheres por ano. Em 1948, o 1th National Cytology Congress aclamou o novo meio de diagnóstico para o câncer do colo uterino como o único capaz de detectar o câncer antes que fosse visível. A vantagem do esfregaço com relação à biópsia - nas palavras de Papanicolaou - “que não pode ser aplicada na escala necessária para revelar lesões precoces”, a comprovação da eficácia do teste e a formação de pessoal treinado levaram à implementação de fundos federais para os programas de *screening* que baixaram a taxa de mortalidade por câncer do colo uterino, atualmente de 4.800 mulheres por ano, nos Estados Unidos. (39,64,92,99,120)

Em 1954, no Atlas of Exfoliative Cytology, Papanicolaou descreveu o sistema das cinco classes, que atendia às necessidades de terminologia em Citopatologia e que perdurou por 35 anos:

Classe I: ausência de atipias ou de células anormais

Classe II: citologia atípica, mas sem evidência de malignidade

Classe III: citologia sugestiva, mas inconclusiva para malignidade

Classe IV: citologia fortemente sugestiva de malignidade

Classe V: citologia conclusiva para malignidade

Papanicolaou considerou a classe V como “o único grupo conclusivo”, reconheceu que “graus variados de erros de interpretação são esperados em cada um dos outros grupos” e enfatizava que “o esfregaço não elimina a necessidade de investigação clínica cuidadosa e do exame completo do corte de tecido por patologista qualificado”. (64,92)

Segundo Frable, “a história da Citologia é breve em tempo e rica em personalidades”, como George Wied, Leopold Koss, James Reagan, além do próprio Papanicolaou, que foi o autor de 158 publicações, premiado, estampado em selos, na cédula de 10.000 dracmas e em 1960, foi indicado para o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, ficando em terceiro lugar. Wied desenvolveu estudos sobre as inflamações e

infecções cérvico-vaginais; Koss usou o nome coilócito (*koilos* = cavidade), em 1956, para a célula denominada por Papanicolaou “célula navicular discariótica”; Reagan usou critérios objetivos para análise e formulação de critérios reprodutíveis, iniciando a metodologia em citologia e definiu os termos displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo em 1957. Reagan e Koss conseguiram colocar a citologia ginecológica em base morfológica sólida, através da correlação dos achados do esfregaço com a histopatologia, construindo a ponte entre a Citopatologia e a Patologia cirúrgica. (39,64)

A descrição do coilócito por Koss e Durfee em 1956 - a teoria de J. Ernest Ayre publicada em 1960, de que essa alteração pré maligna poderia ser resultante da ação de um vírus carcinogênico e a sua interação com o DNA viral, uma etapa da carcinogênese - a detecção de células infectadas pelo herpes vírus hominis, por Naib, em 1961 e - finalmente - a detecção do papiloma vírus humano dentro do coilócito por Meisels, na década de 70 - estabeleceram uma relação de casualidade entre a infecção pelo HPV e as lesões epiteliais do colo uterino. Desde então, poucos citopatologistas alertam para que a ponte entre a a Citopatologia e os agentes infecciosos seja reconstruída.(24,66,99)

O interesse pela carcinogênese viral e a capacidade de se identificar vários tipos de células descamadas das lesões do colo uterino, descritas nas décadas de 50, 60, 70, vinham mostrando incômodas variações entre os laboratórios e inquietação no sentido de que fosse adotada uma nomenclatura melhor. O teste de Papanicolaou, referido na literatura como “um triunfo da Medicina moderna na luta contra o câncer” estava sendo questionado por advogados e testemunhas experientes, os laboratórios submetidos à pressão para reduzir os custos sem levar em conta o trabalho humano intenso para um procedimento altamente especializado e o uso da tecnologia era comprovadamente muito caro. Mas as providências só foram tomadas quando o Wall Street Journal (November 2,1987, p.1-20) publicou matéria alertando o público para as falhas do teste que foram imputadas aos microscopistas e laboratórios; foram divulgadas outras matérias em jornais, revistas (Wall Street Journal, Dec 29, 1987, p. 17; Newsweek, Jan 25, 1988,

p.54; Washington Insider's Focus, July 24, 1987, p.1), televisão e rádio, sobre a taxa de falso-negativos em torno de 20% e, como resultado da preocupação do público frente ao noticiário alarmante, o Congresso americano aprovou emenda rigorosa à lei Clinical Laboratory Improvement Act – HR 5471 (apud Koss,1989) e a CLIA 88 passou a regulamentar as atividades dos laboratórios nos Estados Unidos da América do Norte. Em vista disso, o National Cancer Institute patrocinou a conferência realizada em Bethesda, Maryland, em 1988, direcionada para os problemas dos profissionais da área de Citopatologia, muito preocupados com os processos judiciais de má prática que, no momento, ainda é um grande problema da Medicina norte-americana. Na primeira conferência multidisciplinar, as controvérsias com relação à terminologia emergiram e as emoções tornaram-se difíceis de serem contidas. O Sistema Bethesda e grupos internacionais como a Organização Mundial de Saúde,1973, Munich Nomenclature,1974, Royal College of Pathologists e British Society for Clinical Cytology, 1986, consideraram que as categorias definidas por Papanicolaou apresentavam quatro maiores deficiências, citadas como razões para serem abolidas: 1) não refletia o conhecimento atual do câncer cervical, 2) não tinha equivalência na terminologia de diagnóstico histopatológico, 3) não apresentava diagnóstico para lesões não cancerosas e 4) como resultado de numerosas modificações ao longo do tempo, não refletiam uma interpretação diagnóstica uniforme. (6,7, 24,,35,39,64,66,99,100,102,109,118).

Uma avaliação do Sistema Bethesda como proposta de discussão permanente sobre a Citopatologia moderna mostra pontos positivos que são a discussão sobre conteúdo científico *versus* sua prática e sua remuneração, que continuaram nos *workshops* realizados em 1991- em que foram apresentados alguns resultados e feitas algumas correções - e em 2001- quando pouco foi acrescentado ao que tinham admitido por consenso. (1, 9,35,68,69,70,77,78,79,80, 81,100,102,117,118,121,126)

No Brasil, onde a história da ciência e de suas personalidades é limitada, e a cooperação entre Instituições é incipiente, um fato marcante ocorreu na década de 70,

quando os anátomo-patologistas em São Paulo, foram continuamente convocados pelos ginecologistas, para realizarem exames de citologia vaginal e ampliar a prevenção do câncer do colo uterino iniciada em outros Estados como Rio de Janeiro e Pernambuco. Desde então, todos vem prestando adequado atendimento a esse grupo de pacientes. A perspectiva do tempo, no entanto, vem mostrando que, devido ao grande número de exames de Citologia Oncótica Vaginal nos laboratórios públicos ou privados, muito maior que o número de biópsias, atuamos mais como citopatologistas do que patologistas. O raciocínio de um exame de citologia oncótica é indutivo, enquanto que o anátomo-patologista utiliza o raciocínio dedutivo e indutivo. O prejuízo do raciocínio dedutivo do patologista segue paralelamente à queda na eficiência do atendimento médico à população como um todo, crise nas Instituições e sacrifícios para o médico brasileiro como ser humano e trabalhador. Ao contrário, nos hospitais com padrão de qualidade reconhecido, o serviço de Anatomia Patológica acompanha o padrão de qualidade no mesmo nível. (33,40,86)

1.2 - O INTERESSE DOS MICROBIOLOGISTAS NO POTENCIAL DA CITOPATOLOGIA EM DIAGNOSTICAR INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO GENITAL NA MULHER:

Os microbiologistas adotam classificações e critérios para descrever a flora encontrada no ecossistema vaginal, o que teve seu marco inicial com Doderlein em 1892. Mais de um século depois, consideram que ainda há compreensão insuficiente dos agentes etiológicos, falta de critérios reprodutíveis e nomenclatura pouco compreendida. Eschenbach (1993) observa que "novos métodos práticos de diagnóstico necessitam ser desenvolvidos" para infecções do trato genital feminino como a vaginose bacteriana (BV). Brunham et al. (1984) refere que o diagnóstico clínico das doenças sexualmente transmissíveis é dificultado pela falta de critérios objetivos para classificar e diagnosticar a inflamação cervical. O resultado é uma nomenclatura confusa para designar os processos

inflamatórios cervicais, como: cervicite "aguda" e "crônica", "erosão cervical", "doença inflamatória cervical", "descontinuidade cervical", "cervicite muco-purulenta", "cervicite papilar", "cervicite folicular" e "cervicite hipertrófica". As designações misturam ou confundem os processos inflamatórios com as alterações fisiológicas que ocorrem na cérvix durante a vida reprodutiva e o ciclo menstrual, e não diferenciam ectopia cervical de cervicite. Esses termos para a reação inflamatória são adotados por ginecologistas, citopatologistas e anátomo-patologistas mas são escassos os estudos de correlação entre o agente etiológico ou fatores predisponentes e a histopatologia cérvico-vaginal, com exceção das lesões causadas pelo HPV .(18,30,34)

Embora os microbiologistas não sejam treinados para reconhecer as variações fisiológicas do número de leucócitos presentes na vagina durante o ciclo menstrual, que são evidenciadas no esfregaço citológico, reconhecem o que chamam de mucopus e estabelecem as bases de apoio para o diagnóstico de endocervicite (cervicite muco-purulenta) ou cervicite, que são: 1) Os dados clínicos referentes à inflamação da endocérvice: ectopia, sangramento, corrimento endocervical amarelo, esverdeado ou com odor característico e 2) A contagem de leucócitos ao exame bacterioscópico corado pelo Gram. Brunham et al. (1984) foi quem primeiro propôs os critérios objetivos para diagnóstico de cervicite nos esfregaços corados pelo Gram e que são adotados como critérios internacionais: 21-30 neutrófilos (PMN) por campo com aumento de 400 vezes em 10 campos em média, ou 10 ou mais PMN por campo com aumento de 1000 vezes. Vários autores na literatura afirmam que a cultura é tediosa por ser demorada, além de cara. (18,110,115)

Nas publicações em que o exame citológico é comparado com exames microbiológicos da secreção vaginal, autores da área de Microbiologia expressam seu interesse sobre as possibilidades de diagnóstico de inflamação e dos agentes etiológicos de infecção visíveis com a coloração de Papanicolaou. Apresentam como principais requisitos para que esses diagnósticos sejam firmados: que seja especificado se a

colheita da secreção foi realizada na vagina ou cérvix, para que seja determinada a origem do processo, e que sejam definidos critérios para o diagnóstico microscópico. Eckert et al. (1995), usando como critério de inflamação a presença de 3+ ou mais PMN / campo, consideraram "inflamação densa" quando 50% das células epiteliais estavam obscurecidas pelos PMN e verificaram extraordinária coincidência entre a presença de inflamação densa no esfregaço de Papanicolaou e no Gram, este avaliado com o critério de 30 ou mais PMN / campo de 1000 vezes. Em 1.829 pacientes divididas em grupos de alto e baixo risco para doenças sexualmente transmissíveis, Eckert observou associação entre os dados clínicos, os agentes pesquisados - *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, HSV e *T. vaginalis* - e a presença de inflamação em 92% pacientes de alto risco e 74% das pacientes de baixo risco com inflamação densa e ectrópio; e ainda, em 33% e 19% com inflamação densa, também denominada mucopus. Os autores acrescentam que os achados do Papanicolaou não devem substituir culturas; que a maioria das citologias são feitas em clínicas em que a detecção dos patógenos é limitada e que a conduta para as pacientes sem patógenos detectados mas com presença de inflamação no esfregaço citológico necessita ser determinada. (26,30,63,91)

Os microbiologistas também tem interesse que o exame citológico e microbiológico se aproximem e apresentem resultado comum ou compartilhado por causa da preocupação com a incidência das doenças sexualmente transmissíveis (DST). Faye Kette et al. (1993), do Instituto Pasteur, comentam que "não se sabe a dimensão do problema" das DST; Sweet (1998) refere-se à cervicite muco-purulenta como "o maior problema de saúde pública" enquanto também refere que "o diagnóstico de cervicite muco-purulenta- MPC, não é dado nos Estados Unidos". Brunham et al. (1984) foram ainda mais enfáticos ao afirmarem que a MPC é o correspondente ignorado da uretrite não gonocócica (NGU) no homem" e "enquanto a NGU é logo reconhecida e tratada, a cervicite é raramente reconhecida e, mesmo quando reconhecida, nem a mulher nem o parceiro são tratados com antibióticos". Baldy (1985) acrescenta que as DST são

endêmicas em todo o mundo, importantes do ponto de vista epidemiológico e os preconceitos que ainda prevalecem passaram a ser afetados pelo impacto psico-social causado pela AIDS e pelas observações científicas de que a inflamação genital predispõe à infecção pelo HIV. Sweet (1998) refere ainda, que vem sendo observada maior incidência de HPV, de SIL e de disseminação do HIV associada à cervicite mucopurulenta e que três mecanismos potenciais estão implicados para que a inflamação seja o maior fator predisponente á infecção pelo HIV pela via cervical: (8,18,30,36,37,38,77, 110,111)

1 - recrutamento de células inflamatórias para a mucosa cervical produzindo aumento da concentração de linfócitos CD4 infectados pelo HIV e de monócitos-macrófagos infectados

2 - a replicação do HIV torna-se aumentada na presença de inflamação

3 - cervicite com micro-ulceração e mucosa friável torna-se uma porta de entrada para o vírus ou para células infectadas pelo vírus. (110)

Alguns Citopatologistas como G. Wied e M. Bibbo, ainda nas décadas de 50 a 70, na Universidade de Chicago, iniciaram estudos sobre a potencialidade do exame de citologia cérvico-vaginal em diagnosticar inflamação ou infecção e codificaram os agentes visíveis com a coloração de Papanicolaou de F1 a F11, classificação que foi adotada pela Organização Mundial de Saúde e apresentada formalmente no Brasil em 1976, durante o Tutorial of Cytology, em São Paulo. Desde então, o exame do esfregaço vaginal não vem acompanhando o conhecimento atualizado da Microbiologia, apesar de continuar sendo utilizado na prática com a mesma finalidade devido à fácil obtenção, rotina e baixo custo. A solução do problema é afetada por duas tendências opostas. A primeira delas admite que a conclusão de inflamação e / ou infecção não deve constar do laudo do exame citológico, o que se torna inevitável se utilizada a citologia em meio líquido. Young e Kline (1994) comentam ainda, que “a revisão das alterações reativas ou reparativas tem a potencialidade de aumentar dramaticamente a carga de trabalho dos patologistas”;

comentário semelhante também foi publicado por Malik et al. (2001). Entretanto, se o citopatologista constata determinado microorganismo e inflamação no esfregaço de Papanicolaou e não registra esse achado no laudo, estará deixando de informar ao clínico, um achado importante para a avaliação da amostra na prevenção do câncer ginecológico. Do mesmo modo, está se omitindo de auxiliar a triagem dos casos em que há possibilidade de infecção por via ascendente como doença inflamatória pélvica ou puerperal e ainda, infecção pelo HIV. (7,40,66,81,86,110,111,122,126)

A outra opção é que o citopatologista obtenha maior conhecimento sobre as inflamações e agentes de infecções ou DST na mulher e atue em conjunto com o microbiologista, de modo que a combinação dos dois exames possa fornecer ao ginecologista, o esclarecimento necessário para a solução dos casos. O Sistema Bethesda e o SUS mantém as especificações, ou tópicos, referentes aos microorganismos visíveis com a coloração e Papanicolaou, pela evidência do papel do exame citológico nesses diagnósticos e possível interesse nesses estudos. (1,2,6,11, 26, 31,77,117)

1.3 - O ECOSSISTEMA VAGINAL

Estudos de Microbiologia mostram que a vagina não é estéril e que inúmeros microorganismos fazem parte do ecossistema vaginal, de maneira semelhante ao que ocorre em outras cavidades do corpo como a boca e o intestino. A pesquisa microbiológica compreende estudos do tipo qualitativo e quantitativo, considerando os seguintes aspectos: 1) Incidência e prevalência: faz-se apenas a identificação dos microorganismos presentes na amostra, sem quantificar ; 2) Estudos quantitativos: são usadas diluições, vários meios seletivos e a contagem de colônias é quantificada em log10 ; 3) Estudo com meio seletivo para isolar determinado microorganismo ; 4) Provas de DNA homólogo. Atualmente a flora vaginal é conhecida como uma combinação de microorganismos aeróbicos e anaeróbicos, mas há debates e questões, na área da

Microbiologia: A presença ou a ausência de organismos indica saúde ou doença? Uma infecção no trato genital inferior é causada por determinada bactéria ou resulta de alterações quantitativas da flora existente? Quais são os microorganismos e fatores envolvidos? Se a vagina não é estéril, por que fazer cultura? (42,53,71,72).

1.3.1 - O desenvolvimento do conhecimento sobre a microflora vaginal:

A microbiologia descritiva da flora vaginal iniciou-se com Doderlein em 1892, que evidenciou bacilos Gram positivos na vagina normal. Doderlein e seus contemporâneos consideraram a flora homogênea e os bacilos de Doderlein foram depois classificados como membros do gênero *Lactobacillus*. No início do século XX, alguns pesquisadores se destacaram e ainda são citados nas publicações, dentre eles Schroeder que em 1921, classificou a flora vaginal usando a coloração pelo Gram em três tipos: 1) A menos patogênica, com predominância de lactobacilos; 2) Estágio intermediário; 3) A mais patogênica, na qual os lactobacilos eram ausentes e com presença de outras bactérias ainda não identificadas. A classificação de Schroeder, que continua sendo usada em trabalhos recentes, é conhecida como flora tipo I,II e III, respectivamente. (14,34,96)

No espaço de 80 anos até os nossos dias, várias publicações vem demonstrando a variedade de microorganismos presentes na vagina, que habitualmente contém flora heterogênea, mesmo considerando-se as dificuldades para a comparação dos resultados dos estudos. Há falta de uniformidade na seleção das pacientes e dos meios de cultura seletivos nos vários trabalhos, as técnicas disponíveis para identificação de bactérias em gêneros e espécies variam de um laboratório para outro ou não estão adequadamente padronizadas e além disso, há controvérsias sobre o emprego da taxonomia, bem como controvérsias acerca do que é normal ou patológico.(14,17,34,71,72,96)

1.3.2 - As características da microflora e do ecossistema vaginal:

Microflora é a coleção única de microorganismos presente em cada área do corpo e que é dependente das condições fisiológicas locais. Apenas os microorganismos

com propriedades genéticas e bioquímicas que lhes permitam o melhor uso das condições ambientais existentes serão capazes de sobreviver, proliferar e constituir a microflora normal. A microflora vaginal é variável dentro de certos limites porque é dinâmica e não estática, e ainda difere em regiões anatômicas da vagina e da cérvice: o orifício externo do colo e o canal cervical inferior apresentam flora semelhante à vaginal, mas o canal cervical superior é estéril, ou contém escassos microorganismos.(14,71, 72,96)

A microflora associada aos tecidos na vagina, forma o ecossistema delicadamente equilibrado, com o meio vaginal controlando os microorganismos e estes, por sua vez, controlando o meio vaginal. O ecossistema altera-se apenas sob pressão de estímulos externos, ou por estímulo hormonal, e volta ao equilíbrio com a retirada ou desaparecimento do estímulo. Segundo Redondo-Lopez (1990), o desequilíbrio entre os microorganismos que têm função fisiológica pode resultar em predisposição à doença, de modo que microorganismos que não são patogênicos no local onde habitam, poderão provocar doença local ou a distância sob circunstâncias que predisponham à sua virulência. Para a investigação do papel das bactérias na infecção vaginal é necessário o conhecimento da microflora normal. Larsen e Galask (1980) sugerem que na colonização, há uma relação simbiótica entre os microorganismos, enquanto que no aparecimento de doença, estabelece-se uma relação sinérgica favorecendo os patógenos oportunistas; além disso, a ineficiência do antagonismo da flora nativa também pode favorecer os patógenos. Aceita-se largamente que a infecção originada na flora endógena depende não apenas do tipo de microorganismo presente, mas da intensidade da sua proliferação ou abundância e das condições favoráveis ao aumento da sua virulência, em hospedeiro suscetível. (14,17,42,71,96).

O *Lactobacillus*. é o organismo numericamente dominante na vagina normal, tendo sido descritas cerca de 80 espécies. Há um consenso de que a maioria dos lactobacilos são aeróbios ou anaeróbios facultativos - microorganismos capazes de se replicar

imediatamente na presença ou ausência de oxigênio - ou são anaeróbios obrigatórios ou estritos - algumas espécies de microorganismos incapazes de replicar na presença de O₂. Os microbiologistas discutem se os anaeróbios facultativos deveriam ser agrupados como “totalmente anaeróbios” ou “totalmente aeróbios” e o motivo da confusão é que a atmosfera usada nos testes é que determinará se as espécies de lactobacilos vão ser classificadas como anaeróbios obrigatórios ou não. O *Lactobacillus* pode crescer no ar ou em atmosferas com 3 a 10% de CO₂, denominadas microaerófilas. De maneira geral, na mulher em idade reprodutiva, a proporção de anaeróbios é maior ou igual aos aeróbios. Os anaeróbios constituem 50 a 90% da flora, o que mantém certa estabilidade durante a vida. Há diminuição da quantidade de bactérias no período do ciclo menstrual em que ocorre o pico de estrógeno e aumento durante a descamação do epitélio. Na semana que precede a menstruação, a diminuição significativa dos aeróbios é relacionada ao influxo de leucócitos. O maior número de espécies de bactérias é verificado durante a menstruação. (14,71,96)

1.3.3 - O habitat da microflora:

No trato genital inferior feminino, formam o habitat da microflora: a mucosa, as secreções e o pH vaginal. A mucosa é constituída pelo epitélio não queratinizado que se torna espesso ou adelgado pela ação hormonal. O que está classicamente estabelecido é que os estrógenos ovarianos exercem influência trófica sobre o epitélio vaginal causando o seu espessamento e o glicogênio é produzido à proporção que as células amadurecem desde a camada basal até a superficial, o que resulta em auto-fermentação e produção de ácidos. O depósito de glicogênio é também proporcional ao número de células. O nível de glicogênio e dos ácidos produzidos pelo seu metabolismo mantém-se constante nas células epiteliais, e o meio ácido restringe a flora às espécies de bactérias ácido-tolerantes. A morfometria confirma a ação do estrógeno na maturação do epitélio, que já está espessado no meio do ciclo, fase a partir da qual passa a

predominar a produção de progesterona pelo corpo lúteo, produzindo descamação superficial do epitélio, que se torna adelgaçado. Através das gap junctions - junções comunicantes, passam fluidos mas não macromoléculas; essa transudação é também controlada pelo nível de estrógeno e conseqüentemente se reduz, quando diminui a espessura do epitélio, na segunda metade do ciclo. As secreções que estão presentes no canal vaginal e banham o epitélio, são provenientes apenas em mínima quantidade- 1 a 3g / 24 hs- da própria vagina, que não contém glândulas secretoras, e a secreção de aspecto físico mucoso, provém das glândulas de Bartholin, de Skene, das glândulas endocervicais (que produzem 20 a 600mg do muco cervical por dia) das glândulas endometriais e das trompas de Falopio. A secreção produzida pela vagina contém proteínas, provenientes da transudação de proteínas séricas- albumina, imunoglobulinas, aminoácidos- e contém carboidratos, uréia e ácidos gordurosos, estes responsáveis pelo odor. O muco cervical, que é um importante componente da secreção excretada na vagina, contém 90 a 95% de água, sais orgânicos e inorgânicos, lisozima e mucina. A mucina, uma glicoproteína, é o mais importante componente do muco cervical, sendo que a sua taxa de secreção é função do número de unidades secretoras do epitélio endocervical e da resposta hormonal. Estão também presentes na secreção vaginal células epiteliais e leucócitos, conforme a data do ciclo. O pH vaginal e das secreções, têm como especial característica, a de ser variável durante a vida, desde a vagina pseudomatura neonatal, passando pelo ciclo menstrual e vida reprodutiva até a menopausa. O pH é o $\log_{10} [H^+]$, um termo físico-químico e $[H^+]$, ou concentração de íons hidrogênio, é uma função recíproca do pH: quando o $[H^+]$ aumenta, o pH diminui e vice-versa, devendo ser considerado da mesma maneira que o $[H^+]$, Na^+ , K^+ , CO_2^- , HCO_2^- e Cl^- e podendo-se tomar como base o pH da água = 7.0 ou $[H^+] = 10^{-7}$ moles / litro. O pH define a acidez de uma solução e o pH ácido resulta em aumento do potencial de oxidação-redução, ou pressão de elétrons. O potencial redox alto inibe diretamente o crescimento de bactérias; no pH neutro, há menor potencial redox, o que

favorece o crescimento dos anaeróbios facultativos no lúmen vaginal, onde o oxigênio normalmente é baixo. O consumo de O₂ pelos leucócitos também pode diminuir o potencial redox e aumentar o pH e por isso, o muco cervical, que tem pH 7,0, torna-se alcalino quando ocorre cervicite. A relação do pH ácido com a predominância de *Lactobacillus* não está comprovada ou é considerada desconhecida, mesmo que sejam acidófilos e proliferem em pH de 3,5 a 4,5, níveis encontrados na vagina. A relação de causa e efeito não é explicada porque o pH vaginal frequentemente não se correlaciona nem com a presença nem com a ausência de *Lactobacillus*. Nas pacientes submetidas à terapia com estrógeno, há modificação do pH mas não, da quantidade de *Lactobacillus*. Na menopausa, a diminuição do glicogênio do epitélio nem sempre é acompanhada da diminuição de *Lactobacillus*; Larsen e Galask (1982), administrando estrógeno em mulheres na pós-menopausa, verificaram discreto aumento da flora anaeróbica de *Lactobacillus*. Acredita-se que o pH vaginal ácido é o fator primário que controla a composição da microflora vaginal. O ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus* contribui para a acidez, mas há controvérsias se é o principal responsável pelo controle do pH, ou se outros ácidos gordurosos produzidos pelas células do epitélio vaginal e liberados na secreção são mais importantes. O glicogênio é quebrado por enzimas secretadas por células epiteliais escamosas ou por bactérias do meio vaginal e muitas linhagens de *Lactobacillus* são capazes de metabolizar o glicogênio em glicose e ácido láctico por fermentação homolática; outras linhagens realizam a fermentação heterolática em que a metade da glicose produzida é convertida em ácido láctico e o restante forma dióxido de carbono, álcool, ácido fórmico ou ácido acético. No ciclo menstrual, a variação do pH é muito conhecida: no início do fluxo menstrual, o pH já está aumentado, atingindo o pico de 7.0 durante o fluxo máximo no 2º ou 3º dia, quando a pressão parcial de O₂ está aumentada ; o pH então cai para 4,0 a 4.5 nos próximos três dias e permanece constante até o 21º dia. As razões para essa variação do pH, também são desconhecidas mas pensa-se que está ligada à influência do estrógeno sobre o metabolismo do glicogênio e

proliferação celular. Nos últimos dias do ciclo menstrual, o pH aumenta de 4.5 para 7.0. pela diminuição do glicogênio proporcional à descamação das células epiteliais e diminui também a quantidade de ácidos produzidos pelo epitélio e pelas bactérias. Na relação sexual, o esperma e o muco lubrificante são fortemente alcalinos tamponando a secreção vaginal e aumentando imediatamente o pH de 3.5 ou 4.0 para 7.0 e assim permanece por mais de 8 horas. Durante a gravidez, aumenta o conteúdo de glicogênio, a concentração do ácido láctico e o pH ácido, condições mais do que favoráveis às bactérias acidófilas: o *Lactobacillus* prolifera e a flora torna-se mais homogênea, o que é considerado um mecanismo de proteção ao feto. (14,25,42,71,90,96)

1.3.4 - As bactérias que compõem a microflora:

A lista de gêneros e espécies de bactérias que compõem a microflora vaginal normal pode ter interesse apenas acadêmico. Redondo-Lopez cita Brown et al. (1989), que identificou 40 gêneros e 94 espécies, entre o total extravagante de 4997 morfotipos, dos quais 1495 não puderam ser identificados nas amostras de 54 mulheres durante três ciclos menstruais completos, mas há poucos estudos quantitativos da flora vaginal normal. A comparação desses estudos resulta em lista extensa de bactérias detectadas, em concentrações que variam extremamente: Aeróbios / anaeróbios facultativos: *Lactobacillus* sp, *Staphylococcus* sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corinebacterium* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; Anaeróbios obrigatórios: *Lactobacillus* sp, *Streptococcus* sp, *Peptostreptococcus* sp, *Eubacterium* sp, *Bacterioides* sp, *Bacterioides fragilis*, *Bacterioides melaninogenicus*, *Bacterioides oralis*, *Prevotella bivia* ou *disiens*, *Bacterioides asaccharolyticus*, *Bacterioides ureolyticus*, *Veillonella* sp, *Fusobacterium* sp, *Propionibacterium* sp, *Bifidobacterium* sp, *Clostridium* sp, *Ureaplasma urealyticum* e *Sarcina* sp. A maior concentração, de *Lactobacillus* aeróbios e anaeróbios, é seguida pelas espécies de *Peptococcus*,

Bacterioides sp, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium sp* e *Eubacterium sp*, nesta ordem. Redondo-Lopez relaciona em seguida aos lactobacilos, os cocos Gram positivos, o *Ureaplasma urealyticum* e as bactérias anaeróbicas. (17,57,71,72,96)

1.3.5 - As espécies de *Lactobacillus* da microflora, protetoras do ecossistema vaginal:

Lactobacillus e *Actinomycete* são as duas bactérias chamadas *Leptotrix* encontradas na vagina; os *Lactobacillus* são *Leptotrichia sp.* e *Actinomycete* são *Bacterionema sp.* Desde os primeiros estudos de Rogosa e Sharpe em 1960, as espécies de *Lactobacillus* geralmente identificadas com o Gram ou em cultura vaginal, foram: *L. acidophilus* e *L. fermentum*, e menos frequentemente isoladas, o *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueki* e *L. salivarius*; além desses, a lista ainda inclui: *L. cateniforme*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. leishmanii* e *L. minutus*. Estudo recente com DNA homólogo coloca dúvidas sobre a especificação do *L. acidophilus* e outras espécies seriam predominantes, na vagina. Considera-se improvável que as diferenças na prevalência de *Lactobacillus* representem apenas variação geográfica e o que mostram esses estudos é que as espécies isoladas variam de uma mulher para outra e em uma mesma mulher em épocas diferentes. É largamente aceito que a colonização da vagina pelos lactobacilos, que chegam a constituir 50 até 96% da flora aeróbica, em concentração de log 7.2 a log 8.7 / ml de secreção, protege o ecossistema contra a proliferação da flora nativa potencialmente patogênica e dos patógenos exógenos. São atribuídos ao *Lactobacillus*, propriedades antagonistas com relação aos patógenos, ou mecanismos de defesa, e a primeira dessas propriedades é a manutenção do pH ácido. O segundo mecanismo é a produção de H₂O₂, que é bactericida, e de outras substâncias anti-microbianas como a lactocidina, acidulina, lactacina B, que são incluídas como bacteriocinas, inibidores proteínáceos poderosos, detectados como produtos de bactérias Gram positivas, com espectro anti-microbiano limitado, usualmente incluindo a

linhagem produtora, mas os inibidores produzidos pelo *Lactobacillus* que se assemelham a bacteriocinas, não agem contra a linhagem produtora. A produção de H₂O₂ pelos *Lactobacillus*, publicada por Wheather et al. (1952) na Nature, pode ser um método de antagonismo bacteriano direto ou através do sistema mediado pela peroxidase. A produção de H₂O₂ ocorre por ação enzimática das flavoproteínas e não é espécie-específica, de modo que, entre lactobacilos da mesma espécie, há os produtores de H₂O₂ e os não produtores. O H₂O₂ atua como auto-inibidor ou é tóxico para bactérias, fungos, vírus e células de mamíferos. Hillier et al. (1993), em estudo com 171 mulheres grávidas entre 35 a 42 semanas de gestação, e classificando a flora em tipo I, II e III, encontraram predominância de *Lactobacillus* produtores de H₂O₂ e produtores associados a não produtores em 61% das mulheres com flora tipo I, 37% com flora tipo II e 5% com flora tipo III; *Lactobacillus* não produtores de H₂O₂ foram encontrados em 34% de flora tipo I, 48% tipo II e 60% tipo III; deduziram que, na flora tipo III, a diminuição dos lactobacilos é devida aos tipos produtores de H₂O₂; foi verificada ainda, ausência de lactobacilos em 5% de normais, 15% da flora intermediária e 35% da flora tipo III (esta preferencialmente denominada pelos microbiologistas como vaginose bacteriana). Outro mecanismo de ação do *Lactobacillus* para o equilíbrio da microflora vaginal é a competição por aderência por meio da aderência ao muco, formando uma barreira que previne a colonização, ou competição por receptores das células epiteliais. Acredita-se que, para colonizar a vagina, um microorganismo necessita aderir à superfície das células epiteliais, o que ocorre pela interação entre as cargas da membrana celular do hospedeiro e as cargas da superfície bacteriana. O potencial elétrico pode ser medido experimentalmente no uroepitélio e na vagina, onde se pode observar que é também influenciado pelo estrógeno. Experimentalmente, o *Lactobacillus* mostra maior afinidade pelos receptores das células do epitélio vaginal e competem com a *Cândida albicans* e *Gardnerella vaginalis* podendo deslocar esses patógenos. Entretanto, não está devidamente esclarecido se *Lactobacillus* interferem com a

aderência de patógenos ao epitélio vaginal in vivo, quando não deve ser excluída a influência do ciclo menstrual. Ainda atuam na aderência os biossurfactantes, que são compostos liberados pelos microorganismos com principal função de facilitar a absorção de substratos insolúveis em água e tem atividade antibiótica contra vários micróbios.(10,14,42,57,96)

1.3.6 - Os fatores do hospedeiro que influenciam a microflora vaginal durante a vida:

É estabelecido como premissa, que a microflora vaginal normal defende o hospedeiro contra a colonização anormal, o que conduz o interesse dos investigadores para os fatores do hospedeiro que controlam a flora, nas diferentes fases da vida da mulher: pré-pubertal, pós-pubertal, gravidez e pós-menopausa. São considerados o nível de estrógeno, o pH, o conteúdo de glicogênio e potencial redox. Essas condições são praticamente idênticas na fase pré-pubertal e menopausa, em que há baixo nível hormonal, pH neutro e flora de bactérias menos ácido-tolerantes; na menopausa, as alterações ocorrem lentamente, em um período de 5 a 8 anos e após esse período é que é possível caracterizar a flora característica da idade. Na gravidez, o nível hormonal é o mais alto, mas as demais condições são semelhantes à fase pós-pubertal: pH ácido e grande número de microorganismos tolerantes ao meio ácido. Em seguida ao parto, a flora muda com acentuado aumento dos anaeróbios, o que é atribuído à ação mecânica e queda do nível hormonal. (17,71,72,90,96)

A influência da fisiologia cíclica vaginal, ou ciclo hormonal, sobre a microflora é controversa devido a discrepâncias nos resultados dos estudos. A principal observação é a influência hormonal sobre os *Lactobacillus*, que tem maior prevalência durante a idade reprodutiva e gravidez, e menor antes da puberdade e depois da menopausa. (14,90,96)

1.3.7 - Os fatores exógenos que desequilibram o ecossistema vaginal:

Os fatores exógenos que alteram a microflora vaginal são: cirurgia do trato genital inferior, tratamento anti-microbiano, imunossupressão, câncer invasivo, a atividade sexual e métodos anti-concepcionais. (42,71,90,96)

1.4 - A VAGINOSE BACTERIANA (BACTERIAL VAGINOSIS)

A pesquisa original de Gardner e Dukes em 1954, *Haemophilus vaginalis* Vaginitis é considerada por Eschenbach (1993), o marco inicial da epidemiologia clínica. A publicação inicia-se afirmando que a tricomoníase e monilíase eram conhecidas há duas décadas, porém, o terceiro tipo de infecção, denominada “vaginite bacteriana inespecífica” era diagnosticada por exclusão e não tinha o reconhecimento adequado à sua importância clínica. Achava-se que era causada por muitas bactérias como estafilococos, estreptococos, coliformes, micrococos, difteróides, mas nenhum microorganismo era incriminado como agente etiológico. Era considerada uma coincidência rara, as características físicas idênticas da leucorréia, nessas pacientes. E, obviamente, havia dificuldades nas pesquisas, próprias de 50 anos atrás.(4,34,43)

Gardner e Dukes partiram do pressuposto que a “vaginite bacteriana inespecífica” é uma entidade infecciosa específica causada por um único agente etiológico.¹ Dukes conseguiu, com meio de cultura enriquecido, no segundo caso examinado, cultivar o bacilo pequeno, pleomórfico e imóvel que denominou *Haemophilus vaginalis*, com a concordância de Gardner. O estudo foi realizado com um total de 1181 pacientes, 138 com diagnóstico primário de vaginite bacteriana, e dentre estas, 127 (92%) com um único agente etiológico. Os sinais e sintomas foram correlacionados com o exame a

¹ As denominações inespecífica e específica são usadas em várias circunstâncias em Medicina, o que dificulta avaliar a propriedade do seu uso; em Patologia, classificam-se como inflamações específicas apenas as granulomatosas.

fresco, Gram ou Giemsa e cultura obtida após 48 horas a 37°C, em um total de 1.033 exames. Gardner e Dukes descreveram: a) as características clínicas da leucorréia de volume moderado, homogênea, aderente à parede vaginal; b) o odor “menos ofensivo que na tricomoníase”; c) o pH entre 5.0 e 5.5; d) com o exame a fresco, as células que denominaram *clue cells* ou células-guia, em que chamava a atenção a associação do *H.vaginalis* com as células epiteliais e não com os leucócitos, escassos ou ausentes, e também notaram a ausência dos lactobacilos; e) com a coloração pelo Gram, consideraram um “aspecto surpreendente”, a grande quantidade de pequenos bacilos pleomórficos Gram negativos formando aglomerados fora dos limites celulares; f) descreveram as características das colônias, o crescimento das bactérias em ambiente microaerófilo e a produção de ácidos por fermentação de açúcares; g) verificaram ainda, a presença do *Haemophilus vaginalis* em maridos e a transmissão sexual. (43)

Para estabelecer o *Haemophilus vaginalis* como agente etiológico, foram aplicados os postulados de Koch, mas apenas dois foram preenchidos: isolaram a bactéria de 92% das pacientes (127 de 138 casos) e obtiveram 141 culturas “puras” positivas. Não apresentaram cultura positiva nem sinais clínicos da doença, 10 de 13 voluntárias inoculadas com material das culturas “puras” de *H. vaginalis* e apenas 2, apresentaram cultura positiva. No entanto, a inoculação da secreção vaginal de mulheres com vaginite inespecífica (negativas para sífilis e gonorréia) produziu a doença em 11 de 15 voluntárias em período menor do que sete dias.(43)

Em 1965, Dunkelberg foi quem primeiro avaliou adequadamente o diagnóstico do *H. vaginalis* com a coloração pelo Gram em 132 de 300 pacientes cedidas por Gardner e Dukes, e concluiu que, devido às *clue cells*, a exatidão do exame a fresco era de 95,5% e a do Gram 87,2%, portanto confiáveis, especialmente se utilizados juntos, além de serem adequados à prática de consultório. Mas, até os anos 70, a pesquisa de Gardner e Dukes encontrava apoio de alguns autores e contestação por parte de outros, ao ponto de serem forçados a publicar retificações por não terem detectado o *H. vaginalis* em

baixa concentração. O achado do bacilo com o uso de meios seletivos, em mulheres normais, sem vaginite, e a detecção frequente de infecção assintomática levantavam a questão sobre a sua patogenicidade como agente causal da doença. Mc Cormack, um dos mais radicais contestadores de Gardner e Dukes, desenvolveu estudos sobre os micoplasmas genitais. Verificava-se ainda, a presença do *H. vaginalis* em mulheres com vaginite, em percentagem menor do que 92%, apesar da diversidade na seleção das pacientes e dos métodos de cultura que variavam demais, gerando controvérsias. Em 1959, em estudo subsequente, Gardner e Dukes detectaram o *H. vaginalis* em 52,3% do total de vaginites. A bactéria não requeria hemina para seu crescimento e passou a ser denominada *Corynebacterium vaginale*, mas era catalase-negativa e não se incluiu também nesse gênero. Em 1980, Greenwood e Picket re-classificaram finalmente a bactéria com DNA homólogo, como único membro do gênero *Gardnerella*, em homenagem ao Dr. Gardner. (4,28,34,44)

1.4.1 - As descobertas após a pesquisa de Gardner e Dukes e o teste do

KOH:

Na década de 70, quando o metronidazol estava sendo testado no tratamento da vaginite inespecífica - NSV, a Universidade de Washington tornava-se um centro de pesquisa clínica e microbiológica da entidade. Em 1978, Pheifer et al, investigando a causa da NSV e a eficácia do metronidazol no seu tratamento, fez estudo com rigoroso controle que incluía 13 freiras, separando as pacientes em 2 grupos: “normais” ao exame clínico, ou assintomáticas, e “anormais” ou sintomáticas, com base no aspecto e odor da secreção. Pheifer introduziu o teste do hidróxido de potássio – KOH a 10% que, adicionado à secreção no exame a fresco, liberava o “odor de peixe”, sinal clínico mais evidente nas pacientes sintomáticas. Verificou a eficácia do novo fármaco em 110 pacientes tratadas e a considerou compatível com o papel etiológico de bactérias anaeróbicas na etiologia da NSV, em combinação com o *Haemophilus vaginalis*, uma

vez que o metronidazol erradicava os anaeróbios e sua atividade *in vitro* contra o *H. vaginalis*, um aeróbio facultativo, era modesta . O crescimento dos anaeróbios, em ágar sangue de carneiro e avaliação semi-quantitativa foi igual ou acima de 3+ , maior nas pacientes anormais e identificados em 44 pacientes com culturas mais exuberantes, como peptostreptococos, *Bacterioides corrodens* e *Bacterioides melaninogenicus*. Avaliando os resultados com base na comparação de 18 casos com 18 controles em que, os dois grupos, tinham as mesmas características de idade, raça, estado civil, número de parceiros e mesma clínica de origem, Pheifer demonstrou o *H. vaginalis* como o microorganismo predominante em 17 de 18 casos (94%), 13 com *clue cells* e apenas em 1 dos 18 controles, nenhum destes com *clue cells*. O número de leucócitos / mm³ foi três vezes maior nas 18 pacientes (88.300 / mm³) do que nos 18 controles (29.100 / mm³); verificou ainda, um aumento da prevalência da colonização por micoplasmas genitais, o *M. hominis* isolado em 10 pacientes e o *U. urealyticum* em 16 pacientes e 12 controles. O *M. hominis* persistiu em 19 de 47 pacientes tratadas e o *U. urealyticum* em 63 de 64 pacientes e concluiu que o metronidazol era relativamente ativo *in vivo* contra o *M. hominis* mas não contra o *Ureaplasma urealyticum*. (59,94,108)

1.4.2 - A identificação das bactérias anaeróbicas associadas à *Gardnerella vaginalis*

A presença de bactérias anaeróbicas na vagina normal havia sido publicada por Harris e Brown no Bulletin of the John Hopkins Hospital em 1928, o que foi seguido por registros esporádicos na literatura, até que em 1973, Gorbach et al. estabeleceram definitivamente que os anaeróbios eram um componente importante da flora normal do trato genital. A identificação dos anaeróbios com o Gram é precária, é impossível a sua diferenciação da *Gardnerella* sem a cultura e também são difíceis de serem cultivados; podem ser identificados em pesquisas por seus produtos bioquímicos, para o que são ainda necessários equipamentos sofisticados e caros. A pesquisa de anaeróbios é -

digamos assim - para universidades selecionadas, mesmo no chamado Primeiro Mundo.
(51,96)

Entre a década de 70 e início dos anos 80, quando a microbiologia quantitativa estava apenas se iniciando, Spiegel et al. (1980), em trabalho com cultura quantitativa para anaeróbios, identificou a presença dos seguintes *Bacterioides* e *Peptococcus* em 53 pacientes com NSV: *B. capillosus*, *B. bivius*, *B. disiens*, *B. asaccharolyticus*; *P. prevotti*, *P. asaccharolyticus*. Comparando com os controles, verificou a mudança da flora de lactobacilos produtores de lactato, para flora predominante de *G. vaginalis*, que produz principalmente acetato, associada aos bacterioides, que em geral produziam succinato e a espécies de peptococos, que em geral produziam butirato e acetato. Esses metabólitos de ácidos orgânicos de cadeia curta voláteis e não voláteis, foram detectados por cromatografia e o resultado definido pelo pico de succinato em relação ao lactato, considerado o mais expressivo e maior do que 0,4mm nas pacientes com NSV, tornando-se **s / I** um padrão usado pelos microbiologistas para identificar culturas “puras” de anaeróbios, infecção assintomática e avaliação da resposta à terapia com o metronidazol. Spiegel (1980) demonstrou padrão cromatográfico característico de acetato, propionato, isobutirato, butirato e isovalerato, coerente com o aumento da prevalência de bacterioides, peptococos e *G. vaginalis*, e com a presença de aminas. Acetato e lactato são produzidos por todas as mulheres, sendo anormal o pico de acetato maior que 2 mm, ou quando são detectados, propionato e butirato. A cultura quantitativa mostrou que a bactéria predominante na NSV, a *Gardnerella vaginalis*, atingia a concentração de 10^7 / mm de secreção, que os bacterioides eram o segundo microorganismo mais frequentemente isolado e que os lactobacilos eram ausentes, assim como outras bactérias que poderiam produzir esses ácidos orgânicos como subprodutos do seu metabolismo. Spiegel considerou que o papel relativo dos anaeróbios e da *G. vaginalis* ainda não estava esclarecido e que talvez os anaeróbios fossem os colonizadores primários e a *G. vaginalis* o colonizador secundário, ou vice-versa, ou

poderiam ser sinérgicos. E que, embora a *Gardnerella* possa ser detectada em pacientes normais, com pH vaginal ácido, talvez seja estimulada a se tornar o organismo predominante na NSV, devido à presença das bactérias anaeróbicas que produzem amônia ou aminas, a partir da ação de descarboxilases sobre aminoácidos, aumentando desse modo o pH vaginal. Não era, no entanto, possível, estabelecer os mecanismos pelos quais os anaeróbios agiam, nem quais eram os fatores do hospedeiro capazes de determinar se uma mulher iria ou não apresentar a infecção sexualmente transmissível. (34,105,108)

Estudos subsequentes demonstraram a presença dos seguintes anaeróbios: *Bacterioides* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Mobiluncus* spp, *Eubacterium* spp, *Fusobacterium* spp, *Veillonella parvula*, *Prevotella bivia* (*B.bivia*), *Prevotella disiens* (*B. disiens*), *Porphyromonas* spp e *Prevotella* spp.(108).

1.4.3 - A produção de aminas na BV:

A suspeita da presença de aminas era devida ao odor porque as diaminas, que são sais não voláteis, são liberadas em pH alcalino, tornando-se voláteis. Com o teste do KOH a 10% o “odor de peixe” é exacerbado e foi relacionado especialmente à liberação da trimetilamina por Brand e Galask (1986). As principais aminas liberadas na NSV, a putrescina e cadaverina, demonstradas por Chen et al.(1982) são produtos da descarboxilação da lisina e arginina, respectivamente, e além dessas, foram detectadas a histamina, feniletilamina, tiramina, isobutilamina e metilamina. O sêmen, que tem pH 7,0, também pode liberar as aminas. A *Gardnerella vaginalis* não produz diaminas, o que sugere que são produzidas pelas bactérias anaeróbicas, mas nenhum padrão compatível de produção foi relacionado com a grande variedade de bactérias anaeróbicas que já vinham sendo identificadas. (12,59,108)

1.4.4 - Os “critérios de Amsel” para o diagnóstico da BV:

Na década de 80, os autores mais destacados de estudos realizados na Universidade de Washington foram Amsel e Carol Spiegel. Amsel et al. (1983) estavam interessados no valor diagnóstico de observações e procedimentos simples que podiam ser feitos em consultório, comparados como os métodos caros, menos disponíveis. Por isso realizaram estudo com 397 pacientes consecutivas, para correlacionar os vários critérios clínicos, bioquímicos e microbiológicos já em uso, que mostravam resultados contraditórios na literatura. Amsel comentava que essas contradições ocorriam porque “a maioria dos trabalhos enfocava o micróbio e não a doença” ou “uns pesquisam apenas os sintomas, outros os sinais ou a leucorréia ou as *clue cells*”. O resultado da sua pesquisa definiu os critérios para o diagnóstico clínico, que ficaram conhecidos como “critérios de Amsel” e foram adotados pela Organização Mundial da Saúde. Amsel aplicou: a) **Métodos clínicos:** medida do pH vaginal, teste do KOH a 10%, exame a fresco para *clue cells* (em 10 campos separados com pequeno aumento, acompanhadas ou não de células exfoliadas) e colheita de material para cultura e análise bioquímica; b) **Métodos bioquímicos:** medida do pH, pesquisa de aminas e de ácidos orgânicos; c) **Métodos microbiológicos:** cultura para *Gardnerella vaginalis* em ágar chocolate de carneiro e ágar sangue humano. Os **critérios** estabelecidos para o diagnóstico da NSV foram: 1 - **Corrimento fino e homogêneo**, 2 - **pH vaginal maior do que 4,5**, 3 - **Liberação do odor com KOH a 10%**, 4 - **Presença de aminas anormais na secreção vaginal** e 5 - **presença de *clue cells***. As pacientes que apresentavam dois ou três desses critérios, ou três dos quatro (1-2-3-5) eram consideradas portadoras de NSV e o diagnóstico foi feito em mais de 25% dos casos, a metade assintomática, confirmando a existência da NSV como entidade clínica e talvez com etiologia multifatorial. O pH 4,5 foi estabelecido como o ponto discriminatório, a partir do qual o número de pacientes com NSV aumentava conforme ia aumentando o nível do pH. As bactérias sobre as *clue cells* eram Gram variáveis. A *G. vaginalis* foi isolada com a cultura, em 51,3% do total da amostra, em maior concentração nas pacientes com NSV (e detectada em 4 de 18 pacientes sem

experiência sexual); com o ágar chocolate de carneiro não foi detectada a *Gardnerella* em baixa concentração. Spiegel, em artigo de revisão, em 1991, refere que não foi publicada nenhuma avaliação atualizada desse procedimento. (4,108)

A NSV foi relacionada por Amsel et al, (1983) com a atividade sexual, infecção prévia por tricomonas, anticoncepcional oral e DIU. Sweet (2000) refere que, embora não se conheça exatamente a causa da BV, os fatores predisponentes incluem duchas, DST prévia, mudança de parceiro sexual e uso de DIU. (4,111)

1.4.5 - A denominação Vaginose bacteriana e as conclusões de Spiegel;

Na literatura médica, a NSV era reconhecida com frequência, mas com nome inaceitável: o termo “inespecífico” era contestado, a etiologia microbiana e patogênese ainda estavam sendo elucidadas e havia controvérsias devido à ausência de resposta inflamatória da parede vaginal. Holmes et al.(1981) usaram o nome Vaginose inespecífica; em 1983, Blackwell e Barlow sugeriram o nome Vaginose anaeróbica, considerando que a infecção era primariamente anaeróbica; em 1983, Spiegel et al. usaram o nome Vaginose bacteriana que foi considerado, em 1984, o termo mais apropriado. Schnadig et al. (1989), Hay e Taylor-Robinson (1996) concordam que Bacteriose vaginal, nome casualmente mencionado por Hill em 1982, é gramaticalmente mais correto, em língua inglesa. (13,54,59,101,106)

Spiegel foi autora e co-autora de vários trabalhos e, em 1983, na publicação em que propôs o nome Vaginose bacteriana ou BV, re-avaliou o exame direto com o Gram em 60 lâminas de 397 pacientes consecutivas. Os morfotipos e as colônias foram quantificados de 1+ a 4+ e o resultado comparado com os critérios clínicos, microbiológicos e bioquímicos. Spiegel observou a “extraordinária relação inversa entre a quantidade de *Lactobacillus* e *Gardnerella* ” e notou que os lactobacilos podiam aderir às células epiteliais, confundindo-as com *clue cells*. As *clue cells* foram encontradas em 30 de 31 esfregaços de pacientes com BV e em nenhuma sem BV. *Gardnerella vaginalis* e

Bacterioides spp foram os microorganismos predominantes, os bacterióides ausentes nas pacientes sem BV; em 11 de 25 pacientes com BV notou os bastonetes curvos Gram variáveis que não estiveram presentes em nenhuma paciente normal; duas pacientes tinham BV associada a tricomonas e duas a monília. A cultura demonstrou a *Gardnerella vaginalis* associada a *Bacterioides spp*, *Peptococcus spp*, bastonetes curvos e *Eubacterias spp*. Spiegel classificou flora tipo II como normal, considerando outros dados e, na discussão, considerou que os microorganismos descritos anteriormente por outros autores como coliformes, talvez fossem bacterióides; que os “difteróides” descritos por Hunter e Long (1938), que acreditaram serem lactobacilos - e estreptococos que cresciam também nas culturas, talvez fossem, *G. vaginalis*; que a “vaginite dominada por cocos” de Bergman et al. (1965) e a Kokken Kolpitis de Schnell e Meinriken (1973) eram compatíveis com BV. O Gram concordou com o diagnóstico clínico em mais de 90% dos casos. O Gram e a cultura foram ambos positivos ou ambos negativos em 49 dos 60 casos (25 com diagnóstico clínico de BV e 35 normais ou com vaginite por cândida), com exceção de duas pacientes positivas apenas na cultura; quando havia grande quantidade de morfotipos com o Gram, também era grande a quantidade de colônias ou vice-versa. (4,59,105,106,107,108)

1.4.6 - *Mobiluncus sp.* e *Mycoplasma hominis* incluídos como flora patogênica da BV:

Em 1983, Spiegel et al. publicaram a prevalência dos bastonetes anaeróbicos curvos e móveis na BV e sua resposta ao tratamento. Os bastonetes curvos e móveis, isolados pela primeira vez por Curtis (1914) em paciente com infecção puerperal e só foram registrados novamente em 1954, por Moore, como “víbrios anaeróbicos”, que não vinham sendo detectados nos estudos sobre anaeróbios. Até que, em 1980, Durieux e Dublanchet identificaram 18 tipos em 11% de 330 pacientes com “leucorréia patológica” associada aos víbrios que não podiam ser do gênero *Vibrio* por serem anaeróbios, e

desapareciam com o uso do metronidazol. Verificaram que os vibrios eram produtores de succinato (*vibrions succinato producteurs*), móveis e os dividiram em dois grupos: VSP 1 menores, resistentes ao metronidazol e VSP 2 maiores, ambos flagelados. Spiegel encontrou 10 sub-tipos pequenos, com 1,7um, Gram variáveis, 3 sub-tipos maiores, com 2,9 um, Gram negativos e 3 sub-tipos Gram positivos, imóveis, que cresciam em anaerobiose ou microaerofilia e que talvez fossem parte da flora normal, além da presença de microorganismo semelhante, o *Vibrio succinogenes*. Os bastonetes curvos foram detectados mais facilmente com o Gram, em 31 de 61 pacientes com BV, do que em 6 destas 31 com a cultura, e não foram detectados em nenhum dos controles. Spiegel concluiu que a presença dos bastonetes curvos é também um indicador de BV, com o seu papel na infecção a ser esclarecido. Os bastonetes curvos apresentavam algumas características comuns com os *Anaerobiospirillum*, *Succinvibrio*, *Campylobacter* e *V. succinogenes* ou *Wolinella*, mas eram suficientemente diferentes desses gêneros e era necessário colocá-los em outro gênero. Em 1984, Spiegel e Robertis propuseram o nome *Mobiluncus* (mobil=móvel, uncus=curvo) para os bastonetes vaginais, que teve prioridade sobre *Falcivibrio*, proposto por outros autores. Foram identificadas, com DNA homólogo, duas espécies: *M. curtisii* (*F. vaginalis*) pequeno e Gram variável ou positivo e *M. mulieris* (*F. grandis*) maiores e Gram negativos; e duas sub-espécies: *M. curtisii curtisii* e *M. curtisii holmsii*. Produzem os ácidos succínico, acético, láctico e málico; o *M. mulieris* produz grande quantidade de ácido a partir do glicogênio e o *M. curtisii* produz amônia a partir da arginina. O *Mobiluncus* pode aderir às células epiteliais com pH de 7,5 a 5,5 e sua prevalência na BV vem sendo referida como maior que 77% à microscopia com o Gram e 14 a 96% com a cultura. (12,21,101,107)

Schnadig (1989) em estudo de 150 pacientes com BV, positivas para *Mobiluncus* em 24% de 104 culturas e para *Gardnerella* em 60% de 118, verificou que o exame direto é provavelmente o melhor método para diagnosticar a presença de *Mobiluncus* e que tanto o Gram como o Papanicolaou são satisfatórios, este com sensibilidade próxima da

cultura e especificidade quase de 100%. Denominou *comma cells* as células encontradas em 13 casos, com os bacilos curvos “pendurados por uma das extremidades sobre as bordas dessas células, criando uma aparência de tapete”; verificou ainda, além da presença das *clue cells* recobertas “pela flora heterogênea da BV”, a presença de *pseudoclue cells* recobertas por lactobacilos. Quando havia *comma cells*, havia também *clue cells*. (101,107)

Um estudo da BV em pacientes grávidas acrescentou outro critério de avaliação citado na literatura, introduzido por Nugent et al. (1991), do Vaginal Infection Prematurity Study, um grupo de centros médicos, e já conceituaram a BV como síndrome clínica causada pela mudança da flora vaginal de *Lactobacillus spp*, para *G. vaginalis*, *Bacterioides spp*, *Mobiluncus spp* e *Mycoplasma hominis*. Nugent propôs um sistema de pontos, ou *score*, que permite a gradação da gravidade da BV possivelmente associada a risco de complicações na gravidez, e a contagem de cada morfotipo bacteriano com o Gram, somada a pesos, produziam o *score* de 0 a 10, sendo 0 a 3 normal, 4 a 6 intermediário e maior do que 7, BV. . Os pesos eram maiores para os morfotipos identificados com maior confiabilidade: *Lactobacillus spp*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus spp* e *M. hominis*. O “*score* de Nugent” não depende do clínico, é considerado de fácil execução e reproduzível com concordância, entre microbiologistas do mesmo centro e de diferentes centros. (87,88)

A presença do *Mycoplasma hominis* na BV é considerada uma associação independente, encontrado em 24 a 75% dos casos e em 13 a 20% não associado à BV. (12,114,116)

1.4.7 - A ausência de leucócitos característica da BV:

Do ponto de vista da Microbiologia, os autores consideram que está cada vez mais claro, que as interações microbianas no ecossistema vaginal são complexas tanto na saúde como na doença. Mackovick (1979), sugere que, quando bactérias agem

sinergicamente, podem aumentar a sobrevivência umas das outras favorecendo os fatores de crescimento, melhorando o ambiente local para a provisão de nutrientes essenciais, inibindo os mecanismos de defesa do hospedeiro ou compartilhando fatores de virulência. A reação inflamatória produz fatores quimiotáticos como citocinas, C5, e a quimiotaxia assegura o acúmulo de leucócitos para que a fagocitose subsequente represente a primeira linha de defesa. Entretanto, a BV difere das infecções maciças pela completa ausência de PMN. Admite-se que algum mecanismo evita o contato precoce com os PMN inibindo a quimiotaxia dos monócitos e PMN por um período longo o bastante que permita o crescimento suficiente dos organismos associados para escapar da fagocitose e estabelecer a infecção. (3,42,96)

Os estudos da inibição dos agentes quimiotáticos são dirigidos aos ácidos gordurosos de cadeia curta e o ácido succínico produzidos por bactérias anaeróbicas, inibição que representa importante fator leucotóxico de virulência desde o início da BV. O interesse pelos ácidos gordurosos voláteis é devido aos seus efeitos biológicos nas células eucarióticas como alteração na forma, diferenciação, alteração na composição da membrana e inibição do crescimento. No estudo de Al-Mushrif et al. (2000), *Prevotella*, *Mobiluncus* e *Gardnerella* inibiram a quimiotaxia: *Prevotella* e *Mobiluncus* produzem ácido acético, succínico e ácidos orgânicos voláteis; *Gardnerella vaginalis* produz ácido succínico e acético. O ácido succínico inibe acentuadamente a migração das células, o ácido acético tem efeito menor e o ácido láctico não mostrou inibição significativa da quimiotaxia quando comparadas as pacientes com BV e os controles. Após o tratamento com metronidazol, diminui a grande quantidade de ácido succínico e acético nas pacientes com BV e aumenta o ácido láctico. (3,59)

1.4.8 - As complicações da BV:

A BV aumenta o risco de complicações ginecológicas e obstétricas representadas por sérias infecções, principalmente a doença inflamatória pélvica – DIP não gonocócica:

salpingite, endometrite ou ambas, por ascensão dos microorganismos da vagina ou endocérvice até o endométrio ou trompas. As complicações obstétricas são a DIP pós-aborto ou pós-cesárea, parto prematuro, ruptura prematura de membranas e corioamnionite comprovada histologicamente, com recém-nascido de baixo peso. A BV aumenta o risco de infecção de incisão cirúrgica pós-cesária e pós-histerectomia (*cuff cellulitis*). As bactérias encontradas nos estudos variam, ou as bactérias da BV são detectadas nos casos complicados, associadas a *M. hominis*, *U. urealyticum*, *S. aureus*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *C. Albicans*; o significado da incidência e prevalência dos microorganismos é então avaliado por cálculo estatístico. (12,108,114)

1.4.9 - Principais conclusões sobre a BV que se aplicam ao seu diagnóstico com o exame citológico:

Atualmente a BV é uma das três principais vaginites conhecidas, junto com a vaginite por tricomonas e por fungos. A BV é a mais comum, ocorrendo em 40 a 50% de todos os casos. Parece ocorrer por alteração da flora endógena por mecanismos desconhecidos, mas também pode ser adquirida. Mais de 90% dos parceiros de mulheres com BV tem colonização uretral por *Gardnerella vaginalis*. A quantidade de bactérias na BV aumenta mais de 100 vezes, passando a 10^9 ou 10^{10} e a quantidade de *Gardnerella* aumenta de 100 a 1000 vezes. A formação das *clue cells* ocorre devido a propriedade de aderência da *Gardnerella* à célula epitelial; adere melhor com o pH de 5 a 6 e mais frequentemente do que as outras bactérias da BV; *Mobiluncus* aderem com pH de 7,5 a 5,5. Na BV os *Lactobacillus* produtores de H_2O_2 estão diminuídos. Os ácidos gordurosos voláteis, a *Gardnerella* e o succinato inibem a quimiotaxia dos leucócitos; as aminas e o ácido málico causam irritação e descamação das mucosas. Holmes et al, 1981, relacionam a presença de leucócitos na BV, com cervicite causada por outros microorganismos. (12,34,38,58,59,101)

Na literatura, procura-se uma completa concordância entre os autores acerca dos critérios e métodos de diagnóstico da BV, inclusive do teste de Papanicolaou. O índice de falso-positivo do pH é 47%, da leucorréia 3%, do teste do KOH 1% e das *clue cells* 6%. Spiegel afirma que “são necessários mais estudos sobre a utilidade do esfregaço de Papanicolaou” e Hillier justifica: “porque são usados rotineiramente, seria de grande benefício se pudessem ser usados como base”. Em estudos de avaliação do esfregaço de Papanicolaou no diagnóstico de BV, Platz-Christensen et al. (1989) e Giacomini et al. (1997) encontraram resultados praticamente idênticos: o primeiro verificou que a presença de *clue cells* foi 90% sensível, 97% específico, com valor preditivo positivo de 94% e valor preditivo negativo 95%; o segundo, verificou sensibilidade de 88,7% e especificidade 98,8% com valor preditivo positivo 89,8% e valor preditivo negativo 98,7%. Schnadig (1989) encontrou valor preditivo positivo de 88% quando as *clue cells* estão presentes e 86% quando não são vistas; com o exame a fresco foram detectadas em apenas 67% dos casos. E há uma tendência entre os Microbiologistas, em adotar o Gram e as *clue cells* como diagnóstico definitivo por ser simples, facilmente disponível, com valor preditivo positivo de 75 a 100%. A cultura não é indicada como teste de cura. (12,47,54,58,59,95,101,108)

1.5 - OS MICOPLASMAS GENITAIS

Na prática de exame citológico, a coloração de Papanicolaou não permite que o citopatologista identifique, nos esfregaços inflamatórios, qual é o segundo componente de uma flora tipo II ou de que é composta uma flora tipo III sem *clue cells*. A cultura para micoplasmas genitais é frequentemente solicitada pelo ginecologista, como parte da propedêutica de leucorréia e, neste estudo, a correlação do exame citológico com essas culturas mostrou que a hipótese de que micoplasmas genitais sejam parte de flora tipo II ou tipo III não deve ser excluída. Os micoplasmas genitais são frequentes na nossa região, registrados por Teixeira et al.(1999), em Recife, com padrão microbiológico

diferente da BV devido à ausência de *Gardnerella vaginalis* em 6,94% de 421 mulheres e em 3% de 100 gestantes. A exacerbação dos micoplasmas genitais nas mulheres sexualmente ativas foi representada em 53% pelo *Ureaplasma urealyticum*, 16% *Mycoplasma hominis* e 31% *M. hominis* e *U. urealyticum* associados, semelhante ao grupo das gestantes: 51%, 21% e 28%, respectivamente. (116)

O primeiro micoplasma de origem humana, o *Mycoplasma hominis*, foi detectado por Dienes e Edsall (1937) em abcesso de glândula de Bartholin e desde então, são encontrados como habitantes, saprófitas ou comensais, do orofaringe e da mucosa genital. Em 1954, Shepard isolou outro organismo PPLO (*pleuropneumonia-like organisms*) de negros com uretrite não gonocócica (UNG) primária ou recorrente e o denominou *T-strain* (*tiny*) ou T-micoplasma porque formavam colônias muito pequenas; em 1970, Shepard e Taylor-Robinson o classificaram como *Ureaplasma urealyticum*, o ureaplasma. O *M. fermentans* e *M. penetrans*, isolados mais recentemente, parecem estar associados com a progressão do HIV. (41,112,113,114)

1.5.1 - Os achados do exame citológico na presença de micoplasmas genitais:

Em 1967, Jones e Davson publicaram na Nature, a detecção do *Mycoplasma hominis* no esfregaço de Ayre, que é o mesmo que esfregaço de Papanicolaou, e que é submetido na sua confecção, a fixação menos traumática do que o calor usado para o Gram, preservando a morfologia desses microorganismos e permitindo que sejam visíveis, se estiverem presentes em quantidade suficiente devido à intensa proliferação. Em 233 pacientes, foi feita a correlação entre o exame citológico e a cultura, positiva para *M. hominis* em 24% dos casos, e quando havia intensa proliferação na cultura da cérvix, o esfregaço de Ayre apresentava-se em pequeno aumento, com o aspecto do “esfregaço sujo” de Koss e Durfee: com inúmeros microorganismos pequenos e hematoxilínicos cobrindo as células ou entre as células epiteliais, frequentemente

formando cadeias azuladas entre elas. Os autores relacionaram o aspecto “sujo” a exsudato, restos celulares, citólise e aglomerados de bactérias, também visto em inflamações da cérvix e vagina causadas por outros agentes. Jones e Davson verificaram a correlação direta entre a proporção de esfregaços citológicos considerados positivos para micoplasmas e a intensidade do crescimento do *M. hominis* avaliada pelo número de colônias; quando o crescimento era discreto, o reconhecimento dos microorganismos era menos confiável. Verificaram que era também possível distinguir o “esfregaço sujo” em que as bactérias presentes eram lactobacilos associados a coliformes, ou o *Haemophilus vaginalis*, da forma “cocóide” apresentada pelo *M. hominis*. E sugeriram ainda, que micoplasmas podem causar alterações nucleares. (47,62,75)

Quando o *Ureaplasma urealyticum* e menos frequentemente, o *Mycoplasma hominis* são diagnosticados com cultura e comparados com o exame citológico, seu aspecto no esfregaço correspondia à codificação de “bactéria cocóide”, termo apenas morfológico. O termo foi originado quando Wied e Christiansen (1953) descreveram meticulosamente os esfregaços com o fundo coberto por uma flora, morfolologicamente coco-bacilar abundante, com lactobacilos ausentes e espaços vazios entre as células; denominaram esses microorganismos *Streptococcen-Typ* e um ano depois, Wied os denominou *kokken-typ* ou “bactérias cocóides”, o que obteve concordância de Papanicolaou. Acreditava-se, na época, que sua etiologia era devida à lise de tricomonas, mas também não era afastada a possibilidade de causa hormonal ou infecciosa. Verificava-se que o esfregaço era encontrado na maioria das pacientes na menopausa ou com deficiência de estrógeno, que estreptococos não eram a única bactéria presente e também que os espermatozóides eram vistos frequentemente e os leucócitos escassos. Esse tipo de esfregaço era também observado após o coito, sua formação era aparentemente rápida e a presença de espermatozóides era concomitante com a ausência de lactobacilos ou com a sua transformação em pequenos “cocobacilos”, vista em cultura e que poderia ocorrer em condições fisiológicas. O esfregaço ainda

parecia representar, ao exame citológico, o *H. Vaginalis* transmitido sexualmente. Logo após a publicação de Gardner e Dukes, Pundel notou que o *Streptococcus* era, em sua maioria, o *Haemophilus vaginalis* ; Jones e Davson, o *Mycoplasma hominis*. O passo seguinte foi o desenvolvimento por Wied e Bibbo, da classificação das floras F1 a F10 visualizadas com a coloração de Papanicolaou, que perdurou por mais de 20 anos e ainda hoje é usada no Brasil. Wied e Bibbo fizeram a distinção entre o *H. Vaginalis* - F4, que apresenta *clue cells* e F3 - a “bactéria cocóide”; a classificação também compreendia a “bactéria mista”- F2, quando são visualizados os *Lactobacillus* associados às “bactérias cocóides”, e que corresponde à flora tipo II de Schroeder. Wied publicou em 1957, estudo realizado no Chicago Lying-in Hospital durante três anos, e concluiu que o esfregaço citológico tanto é capaz de determinar a localização principal da reação inflamatória, se na vagina, ectocérvice ou endocérvice, como o grau de intensidade e as características aparentemente aguda ou crônica da inflamação. (11,47,75,122)

1.5.2 - Principais características dos micoplasmas:

Micoplasmas são *Mollicutes*, uma classe de bactérias sem parede, que evoluíram de ancestrais Gram positivos (alguns clostridia) por deleção de gen e redução do tamanho do genoma, de modo que o genoma de um micoplasma tem pouco mais de duas vezes o tamanho de genoma de alguns vírus maiores e são os menores organismos livres existentes, com 125-250 nm, no que se comparam também à clamídia. Os micoplasmas não reverterem à sua forma bacteriana parental, mas é interessante notar que outras bactérias sem parede de defesa, não relacionadas geneticamente com os micoplasmas, podem ser originadas por mutação ou ação de substâncias químicas sobre a sua parede. Assim, as Eubactérias dão origem aos protoplastos e esferoplastos, originados de Gram positivos e Gram negativos respectivamente, e alguns desses

organismos são estáveis e outros instáveis, capazes de reverter à sua forma parental. (15,114)

Os micoplasmas, uma vez que não tem parede, não tem forma ou são extraordinariamente pleomórficos, desenvolvem-se nas superfícies celulares e tem afinidade pelas membranas das células dos mamíferos, a que se ligam por meio de adesinas e de outras proteínas ricas em prolina.; agem por lesão direta citotóxica ou citolítica, ou por competição metabólica; são o único microorganismo que necessita de esteróides para o seu crescimento e síntese de membrana; o *Ureaplasma urealyticum* é o único que necessita de 10% de uréia como fonte de energia metabólica; possui urease que transforma a uréia em amônia, aumentando o pH. O *M. hominis* metaboliza a arginina em uréia, aumentando também o pH. Os micoplasmas não podem ser detectados pelos métodos bacteriológicos usuais porque sua morfologia varia de acordo com o método de exame (p.ex. Giemsa, imunofluorescência), não são identificados com o Gram; suas colônias podem ser muito pequenas, também de aspecto variável e são avaliadas pela contagem semi-quantitativa em placa; outra característica é a de crescerem em meio de cultura completamente livres de células. Os testes bioquímicos e sorológicos apresentam alta incidência de testes positivos em indivíduos normais e a sorologia pode apenas ajudar a diferenciar colonização de infecção; os antígenos, detectados por imunofluorescência ou ELISA, são espécie-específicos e são utilizados para identificar espécies, do mesmo modo como o DNA homólogo e o PCR. (15,112,115)

1.5.3 - Os micoplasmas patogênicos mais frequentes, no homem:

Das 150 espécies de *Mollicutes* isoladas, pelo menos 16 tem origem humana. A infecção é hospedeiro-específica, uma vez que os micoplasmas também infectam animais e plantas. No homem, os micoplasmas potencialmente patogênicos atingem o trato genital e respiratório, e parecem ser parasitas intra-celulares com preferência pelas células mesoteliais. O ureaplasma pode ser detectado no interior das células epiteliais da

uretra. Taylor-Robinson (1998) relaciona como principais colonizadores do trato genital: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma primatum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma spermatophilum* e *Mycoplasma penetrans*. A patogenicidade dos micoplasmas ainda está sendo esclarecida, ou faltam evidências de patogenicidade, mas são definidos como patogênicos: o *U. urealyticum*, *M. genitalium*, além do *M. pneumoniae* do trato respiratório; como possivelmente patogênicos são apontados o *M. hominis*, *M. penetrans* e *M. fermentans*. (15,114)

Os micoplasmas mais frequentemente encontrados no trato genital humano são o *M. hominis* e o *U. urealyticum*. No homem, colonizam a mucosa uretral e na mulher, são mais encontrados em vaginite do que no canal endocervical, fórnix posterior e área peri-uretral, mas há dificuldades em se estabelecer a patogenicidade dos micoplasmas principalmente devido à sua ubiquidade - estão presentes em várias localizações. O *U. urealyticum* pode ser isolado da vagina de muitas mulheres sexualmente ativas e frequentemente o homem é exposto a esses microorganismos. No homem, procura-se entender por que a uretrite não gonocócica - UNG, por micoplasmas não é muito mais comum e por que micoplasmas são detectados em indivíduos sem uretrite; os testes sorológicos não auxiliam na detecção de algum sorotipo com maior potencial de causar doença. Na mulher, há falhas na interpretação dos estudos por falta de definição clínica precisa se as pacientes apresentam cervicite ou vaginite. (42,112,114)

1.5.4 - A exacerbação dos micoplasmas genitais e as características da infecção:

A colonização pode ocorrer no recém-nascido durante a passagem pelo canal de parto, mas tende a desaparecer com a idade. Raramente os micoplasmas são encontrados na urina ou uretra de meninos antes da puberdade, mas já foram detectados em meninas. Após a puberdade, a colonização resulta do contato sexual. Autores como Mc Cormack sugerem que a colonização, principalmente do ureaplasma, aumenta com a

experiência sexual e com o número de parceiros, tanto no homem como na mulher, e a mulher é mais suscetível. *M. hominis* e *U. urealyticum* estão presentes na mucosa genital de mais de 50% dos adultos sexualmente ativos, a colonização dos adultos sem contato sexual não é frequente e a prevalência da colonização diminui após a menopausa. No homem adulto, a infecção tende a ser transitória, podendo regredir espontaneamente e talvez a uretrite ocorra somente quando o homem é exposto pela primeira vez, mas pode ser persistente. No entanto a persistência pode ser mais aparente do que real, devido ao contato sexual repetido. Em 1977, Taylor-Robinson et al. publicaram estudo de auto-inoculação de dois autores que desenvolveram a doença e a manifestação principal foi a presença de PMN na descarga uretral, que persistiu seis meses após tratamento e essa persistência é considerada misteriosa. Esses resultados levaram a se admitir que o ureaplasma é capaz de iniciar a doença crônica. Não se sabe a proporção de homens que tem NGU devida a micoplasmas, referida de 50 a 95%, e há poucos estudos quantitativos. Os estudos verificam que o ureaplasma ocupa o terceiro lugar como causa de NGU, atrás da *Chlamydia trachomatis* e do *Mycoplasma genitalium*, este encontrado em 20% de NGU persistente ou recorrente depois do ataque agudo. Excepcionalmente causam prostatite e epididimite. (112,113,114)

Na mulher sexualmente ativa, a infecção pode ser sintomática ou assintomática, mas a interpretação é difícil. Taylor Robinson e Mc Cormack (1980) referem que, além da falta de definição clínica de vaginite ou cervicite, não pode ser excluída a possibilidade de que outro microorganismo cause a doença e, ao mesmo tempo, proporcione as condições favoráveis para a proliferação dos micoplasmas. O *M. hominis* é isolado com frequência maior do que duas vezes, de mulheres com vaginite ou cervicite em relação às normais, frequentemente associado a outros microorganismos como *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*, *C. albicans* e com pH aumentado mas faltam esclarecimentos sobre o papel patogênico de cada um deles. O *M. hominis* não age sinergicamente com *C. trachomatis* e sua presença na BV é considerada atualmente uma associação

independente. O *U. urealyticum* é isolado tão frequentemente tanto de pacientes com vaginite quanto dos controles. Paavonen et al (1986) estabeleceu associação significativa dos micoplasmas com cervicite muco-purulenta-MPC, em estudo com 323 pacientes, dentre as quais 236 com diagnóstico de MPC, associada ao *U. urealyticum* em 108 de 130 casos e ao *M. hominis* em 55 de 129 casos. Comentando os achados de Paavonen, Sweet (1998) refere que, depois do interesse pela clamídia, perdeu-se o interesse da associação dos micoplasmas com MPC. Kiviat et al. (1985) encontrou o *U. urealyticum* com prevalência de 79% (86 de 109 pacientes selecionadas ao acaso) e 77% (117 de 152 pacientes com suspeita de cervicite) e o *M. hominis* com prevalência de 48% (52 de 109) e 42% (64 de 152);no entanto, após os cálculos estatísticos, apenas a *C. trachomatis* e *T. vaginalis* foram significativamente associados com alterações citológicas inflamatórias. Taylor Robinson e Renton (1999) afirmam que poucas STD são consideradas como causadas pelos micoplasmas e que a identificação do ureaplasma quase não tem valor para o paciente de clínica de doenças sexualmente transmissíveis, útil apenas em algumas ocasiões, porque tanto o ureaplasma como o *M. genitalium* respondem aos mesmo antibióticos e a cobertura com antibióticos na DIP também inclui o *M. hominis*. Apesar dos debates e controvérsias, os micoplasmas estão incluídos no Control of Sexually Transmitted Diseases: a Handbook for the Design and Management of Programs (Family Health International), 1996, o *U.urealyticum* como agente patógeno bacteriano “Transmitido em adultos predominantemente pela relação sexual” e o *M. hominis* como “Transmissão sexual relatada, mas não definida claramente, ou não sendo esta a forma predominante de transmissão”. (27,63,90,110,112,113,114)

1.5.5 - Possíveis complicações da infecção por micoplasmas genitais:

Os micoplasmas genitais podem atingir o trato genital superior e urinário por via ascendente a partir da vagina ou da cérvix e são investigados como agentes etiológicos de DIP não gonocócica e complicações obstétricas, mesmo que a comprovação seja

difícil. A DIP não gonocócica não tem uma única causa: aeróbios e anaeróbios intestinais e clamídia são mais encontrados que os micoplasmas, que podem ser o patógeno primário em alguns casos. A ME mostrou que o *M. hominis* causa apenas edema dos cílios, nas células epiteliais das trompas e não, lesão evidente como na salpingite causada pelo gonococo. Durante o parto, do mesmo modo como outros organismos presentes na vagina, os micoplasmas podem ser encontrados na corrente sanguínea, invasão que não parece persistir nas pacientes sem febre; nos dois dias após o parto, são detectados com a hemocultura, em pacientes com febre pós-parto ou pós-aborto, talvez devido a endometrite. Em mulheres com abortos repetidos, a detecção de micoplasmas no endométrio, líquido amniótico e membranas fetais pode ser apenas o resultado de contaminação; quando são encontrados nos pulmões do feto ou natimorto, sugerem aspiração do líquido amniótico; quando são encontrados nos pulmões e também no cérebro, coração e vísceras, sugerem disseminação hematogênica pelo cordão umbilical. Essas observações não respondem à pergunta se o aborto ocorreu devido à infecção, ou se o feto morreu por outra causa seguida pela invasão dos micoplasmas, ou de qualquer outro microorganismo que atingiu a cavidade amniótica. A invasão da cavidade amniótica principalmente por ureaplasma, é aceita quando há corioamnionite comprovada histologicamente. O ureaplasma é encontrado colonizando a mucosa nasal ou faríngea de RN de baixo peso e admite-se que as mulheres que tem predisposição a terem bebês menores sejam seletivamente colonizadas e que micoplasmas podem ser fator de morbidade e mortalidade peri-natal. Há ainda estudos sobre o papel dos micoplasmas na infertilidade humana porque em amostras de sêmen, o ureaplasma é uma das bactérias capazes de aderir aos espermatozóides e então observa-se diminuição da sua mobilidade e quantidade, com maior número de formas aberrantes; o mesmo pode acontecer no trato genital feminino, obtendo-se melhora após tratamento. Relaciona-se a infertilidade feminina relaciona-se com a detecção de ureaplasma em aspirados de endométrio, sendo pouco encontrados nas trompas. Esses

achados não esclarecem se os micoplasmas tem papel na infertilidade humana, mas há referências de fertilidade em alguns casais após tratamento. O *M. hominis* não causa infertilidade. (113)

1.5.6 - As doenças infecciosas comprovadamente causadas por micoplasmas genitais:

Taylor-Robinson (1998) relaciona as doenças infecciosas genitais em que os micoplasmas podem ter um papel: o *U. urealyticum* e *M. genitalium* na NGU aguda e crônica; o *M. hominis* duas vezes mais que o *U. urealyticum* na BV; o *U. urealyticum* na D. de Reiter, ou artrite com hipogamaglobulinemia duas vezes mais que na artrite reativa adquirida sexualmente - SARA; o *M. hominis* e *U. urealyticum* em parto prematuro; o *M. genitalium* em DIP: o *M. hominis* é pouco implicado em DIP e o *U. urealyticum* pouco implicado em epididimite. (114)

1.6 - A INFECÇÃO VAGINAL E CERVICAL POR TRICHOMONAS VAGINALIS

As infecções por *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans* no trato genital inferior feminino foram as primeiras a serem reconhecidas. O protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis* tem 8 a 20 um, pertence à classe *Zoomastigophora* e foi descoberto na secreção vaginal e descarga uretral masculina, com o exame do material diluído em solução salina, por Donné em 1836, antes mesmo que a leucorréia fosse descrita como sinal clínico por Kronig, em 1895. Em 1916, Hoehne começou a associar a presença do parasita com o quadro clínico de vaginite. (98)

Na década de 50, calculava-se que uma em cada quatro ou cinco mulheres estavam infectadas por tricomonas e dados mostravam que 16% em média, apresentavam o parasita - 21% sintomáticas e 6,5% assintomáticas. Krieger et al. (1988) referem a estimativa de que o parasita infecta 180 milhões de mulheres por ano em todo o mundo e os pacientes assintomáticos são importantes epidemiologicamente porque

representam risco de disseminação da doença. Na América Latina, dados do Instituto Mexicano de Seguro Social (1993) mostraram incidência de infecção por *T. vaginalis* de 3,1% em 800 mulheres, contra 14,39% de infecção por *Candida sp.* (36,37,67,98)

O diagnóstico depende da identificação microscópica da *Trichomonas vaginalis* na secreção vaginal e os principais métodos usados são o exame a fresco, que confirma a motilidade devida ao flagelo e o exame citológico considerado o método mais conveniente porque não há custo adicional. A cultura é o método mais sensível (sensibilidade de 86 a 97%) mas é demorada, pouco disponível nos Estados Unidos e é indicada para o diagnóstico da infecção no homem. As técnicas de coloração com Giemsa, Leishman, Diff-Quik, Fontana, PAS não foram comparadas com a cultura. O valor da imunofluorescência direta com anticorpo monoclonal ainda não está determinado e vem sendo utilizado apenas em pesquisa. (67,78)

Krieger et al. (1988) referem que o esfregaço de Papanicolaou, raramente comparado com os outros métodos de diagnóstico, é 56% sensível, 99% específico e tem valor preditivo positivo que chega a 88% em populações de alto risco, quando o exame citológico tem importante papel no controle da infecção. Nos grupos de pacientes em que a frequência de *T. vaginalis* é baixa, é indicado o exame a fresco que detecta a infecção em 60% a 70% dos casos. Entretanto, Krieger et al. (1988) questionaram a acuidade do exame a fresco que, em uma população de 600 pacientes com 15% de prevalência, as tricomonas foram detectadas em apenas em 60% dos casos; o Papanicolaou foi positivo ou suspeito em 63% mas 31% eram infecções falsas. Lossick (1988) do Centers for Disease Control em Atlanta, em mais de 2000 pacientes, identificou tricomonas com o exame a fresco em 64% das pacientes assintomáticas e em 75% com vaginite, comparados com a cultura; os autores comentam que o Papanicolaou e o exame a fresco são métodos limitados para o diagnóstico de tricomonas e que embora a sensibilidade do Papanicolaou se aproxime do exame a fresco, tem especificidade imperfeita: em uma população com prevalência média de 5%, a identificação de

tricomonas características ou suspeitas (especificidade de 95%) com o exame citológico teria valor preditivo positivo de apenas 40% (60% de falso-positivos). O exame a fresco deve ser executado imediatamente após a colheita e, se negativo, durante dois minutos porque sua sensibilidade depende do estágio da infecção ou quantidade de parasitas (10^4 a 10^5) e também do observador, atingindo até 80% quando os sintomas são característicos, ou 92% com um observador experiente. (67,78)

1.6.1- Alguns dados sobre a patogenicidade da *Trichomonas vaginalis*:

Estudos recentes indicam que a barreira física representada pelo muco que recobre as células epiteliais no local da infecção é a primeira superfície encontrada pelas tricomonas na interação inicial com o hospedeiro. As propriedades de defesa contra a invasão microbiana da mucina, a principal glicoproteína da secreção mucosa, são: o tamanho da molécula, a constituição de peptídeo glicosilado resistente à ação proteolítica e a presença de pontes dissulfídicas hidrofóbicas que dão a consistência de gel. O mecanismo pelo qual as tricomonas atravessam a barreira mucosa é desconhecido mas Lekker e Sweeney (1999) sugerem que a penetração requer adesão, atividade proteolítica e motilidade do parasita. A *Trichomonas vaginalis* possui adesinas e proteinases e sua aderência à mucina é um pré-requisito para a colonização. A aderência é seguida pela secreção de mucinases que solubilizam a matriz mucosa, deslocando o parasita, que penetra na camada de muco devido ao movimento flagelar, até atingir as células epiteliais; ocorre ainda, a inativação de outras moléculas de defesa como imunoglobulinas e lactoferrina. O pH de 4.5 a 7.0 no ambiente vaginal favorece a atividade das proteinases secretadas pelas tricomonas, e a cisteíno-proteinase tem papel evidente na adesão, evasão imune e aquisição de nutrientes. A aderência às células epiteliais é mediada por adesinas e depende da presença de Fe e da atividade das proteinases. A citoaderência permite que as tricomonas persistam no ambiente vaginal.

Estudos detalhados sobre a disseminação e patogenicidade do parasita continuam escassos. (74)

1.6.2 - Características histopatológicas da infecção cervical por *T. vaginalis*:

A *Trichomonas vaginalis* produz o aspecto inflamado da cérvix, com hiperemia, edema, erosão ou ulceração, leucorréia e, na década de 50, começou a despertar interesse na prática de exame citológico, quando era investigado se causaria alterações epiteliais que poderiam ser confundidas com carcinoma *in situ* do colo uterino. Por isso, Koss e Wolinska (1959) realizaram estudo com 172 pacientes infectadas e descreveram as alterações histopatológicas da cérvix, correlacionando-as com as alterações citológicas descritas anteriormente por Wolinska; estabeleceram que o parasita causa inflamação intensa do epitélio cervical, mas não afeta a morfologia nem o comportamento do carcinoma *in situ*, que não apresentou progressão em 4 pacientes, comparadas com 10 controles. A agressão do parasita exógeno provoca principalmente cervicite e atinge especialmente o epitélio escamoso, ao contrário dos agentes bacterianos que parecem preferir o canal endocervical. (65)

Ao exame histopatológico, o epitélio da ectocérvice apresenta intensa congestão vascular com vasos evidentes ao nível das papilas e hemácias extravazadas, que são características histológicas da presença das tricomonas e correspondem ao sinal clínico da “cérvix em morango”. O epitélio apresenta-se descamado na superfície, recoberto por exsudato purulento mas não são frequentes úlceras ativas. As células das camadas subjacentes tem núcleo irregularmente aumentado, ou picnótico indicando necrose e por vezes notam-se células bi-nucleadas. Em todas as camadas do epitélio há edema com alargamento das pontes intercelulares, vacuolização intra-celular peri-nuclear com aumento variável no volume do núcleo, e as células são permeadas por leucócitos. A camada basal pode apresentar-se hiperplásica, com quatro, cinco ou mais fileiras de células pequenas e irregulares atingindo até a metade do epitélio. Histologicamente

chama a atenção que a inflamação no epitélio é muito mais intensa que no estroma, mas essas alterações histopatológicas não são exclusivas da infecção por *T. Vaginalis*, com exceção da congestão vascular ao nível do epitélio. Na transição ecto-endocérvice, o epitélio colunar pode estar completa ou parcialmente substituído por epitélio metaplásico com graus variáveis de maturação; a metaplasia incipiente sem alterações nucleares é frequente. A endocervicite com formação de projeções papilares na mucosa, correspondendo à "erosão cervical" ou "eversão", associa-se à inflamação focal no estroma e não, às tricomonas, ou ao processo inflamatório e congestão vascular cervical. O parasita é raramente encontrado em meio ao exsudato na superfície epitelial. Em 32% dos casos estudados por Koss e Wolinska (1956) as alterações histopatológicas eram insignificantes ou ausentes. (65,98)

1.6.3 - Características citológicas da infecção por *T. vaginalis*:

O esfregaço citológico apresentou inflamação de maior ou menor intensidade em 76% dos casos, com PMN, histiócitos, plasmócitos, linfócitos, alterações das células epiteliais escamosas, raramente das endocervicais, e presença das tricomonas. As alterações das células epiteliais ou atípicas, originam –se na superfície do epitélio pavimentoso ou na *portio*, são representadas por: a) células com halo peri-nuclear e núcleo picnótico correspondentes à vacuolização peri-nuclear vista no tecido; b) eosinofilia de células superficiais que não atingiram a completa maturação e de células intermediárias talvez devido à mudança do pH ou à congestão vascular; c) núcleos e células escamosas discretamente aumentados de volume, cariorrexe e bi-nucleação. A cervicite por tricomonas não causa discariose, ou seja, nenhuma alteração das células escamosas preencheu satisfatoriamente os critérios de discariose, definida como alteração nuclear que se assemelha a câncer mas com citoplasma normalmente diferenciado, ou, de acordo com Papanicolaou, o núcleo tem de estar aumentado, hipercromático e apresentar cromatina anormal. A citólise associada à infecção por

Trichomonas vaginalis, em qualquer fase do ciclo menstrual ocorreu em 20% dos casos, acompanhada de bacilos Gram positivos, o *B. vaginalis*; a citólise e o exsudato purulento formavam o "esfregaço sujo". Koss e Wolinska (1959) consideraram possível que a frequência da citólise era devida à degeneração das células escamosas. Células para-basais aumentadas em número, excediam os 5% de células escamosas jovens descamadas fisiologicamente e que podem estar presentes no esfregaço da mulher em idade reprodutiva ou pré-menopausa; as células para-basais ainda apresentavam pontes intercelulares indicando que não houve morte celular antes da confecção do esfregaço e são portanto, relacionadas com a descamação e regeneração do epitélio e não, com alteração hormonal; essas células desaparecem após tratamento da infecção e apresentam atipias menos frequentemente do que as células superficiais e intermediárias; as atipias não são frequentes nas células endocervicais. (65,78)

A pesquisa da flora bacteriana associada à *T. vaginalis* realizada em 75 casos por Koss e Wolinska confirmou que o parasita é capaz de causar o processo inflamatório, sem agir necessariamente em associação com outro agente bacteriano. Os autores consideraram significativa apenas a associação com *Staphylococcus aureus*, em 6 casos. Krieger et al. (1988) refere dados de co-infecção mais comum com *Ureaplasma urealyticum* em 96% dos casos, *Gardnerella vaginalis* 91%, *Mycoplasma hominis* 89%, BV 57%, *Neisseriae gonorrhoeae* 29% e *Chlamydia trachomatis* 15%. (65,67)

Com o *follow-up*, Koss e Wolinska verificaram que as atipias são reversíveis. Com base em estudo de 66 casos de infecção por tricomonas e carcinoma *in situ* concomitante, de 1953 a 1959 no mesmo hospital, e, em estudo experimental da infecção em olho de coelho com lesão do cristalino, concluíram que é a lesão do epitélio pavimentoso do trato genital feminino, inclusive o carcinoma *in situ*, que favorece a multiplicação do parasita e não, o contrário. (65,67)

1.7 – A VAGINITE POR CANDIDA E OS ESTUDOS DE IMUNOLOGIA DA VAGINA:

Wilkinson, em 1849, foi quem primeiro descreveu o corrimento vaginal associado a fungos. (104)

A vulvo-vaginite por *Candida sp.* (C V V) é encontrada em todo o mundo, conhecida como a causa mais comum de vaginite nos trópicos e atinge mulheres de todas as camadas sociais com alta prevalência nas mulheres com menor nível sócio-econômico. Nos EUA, a prevalência não é monitorada, mas C V V é a segunda causa de infecção vaginal, precedida apenas pela BV. Hurley e De Louvois (1979) que consideravam que a cândida nunca era um comensal, mas sempre um patógeno, calcularam que 75% das mulheres tem pelo menos um episódio de C V V durante a vida reprodutiva; 40 a 50% tem um segundo e provavelmente, 5% sofrem de episódios repetidos, recorrentes, frequentemente intratáveis. (36,37,60,98,103)

1.7.1 - As formas clínicas da infecção e as espécies de cândida isoladas:

A CV V é classificada em **primária (idiopática)**, **secundária**, e - com relação à frequência - em **esporádica** ou **recorrente**. Em 85 a 90% dos casos de C V V, a espécie isolada com a cultura é a *Candida albicans* e nos casos restantes, são isoladas a *Torulopsis glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, e raramente a *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* (*C. pseudotropicalis*) e *Saccharomyces cerevisiae*. (97,103)

1.7.2 -O desenvolvimento do fungo e a transformação da colonização em doença:

A *Candida sp.* é um fungo polimórfico e suas formas fenotípicas representam fases do seu desenvolvimento ou crescimento, que dependem das condições ambientais e nutricionais. As fontes de contágio são a área peri-anal, boca, dedos, genitália masculina

e objetos como o diafragma. Os **blastosporos** são formas unicelulares e brotos do fungo. A forma fenotípica filamentosa de **blastoconídia**, as **pseudohifas**, representam a **colonização** assintomática ou são responsáveis pela transmissão e disseminação - inclusive a disseminação hematogênica. O fungo germinado, com formação de **micélio** ou **hifa** é a forma fenotípica de invasão tecidual, responsável pela **doença sintomática**. Hifas são múltiplas unidades celulares divididas por septos e ramificam-se de outra hifa ou por formação do tubo germinativo (*germ tube formation*), que é a germinação de blastosporo. (97,103,104)

A colonização da mucosa pode iniciar-se com um pequeno inóculo de 10^2 células / ml, seguida da aderência da cândida ao epitélio, propriedade de virulência que é relacionada com a manoproteína, uma proteína de superfície, e à produção de fosfolipases. A aderência da *C. albicans in vitro* varia muito entre as pacientes mas a ancoragem da cândida ao epitélio deve ser suficiente para que não seja deslocada pela cinética do fluxo da secreção vaginal. Na colonização são encontrados esporos e pseudo-hifas em pequeno número: $<10^3$ / ml. Em seguida à ancoragem, ocorre a formação do **tubo germinativo**, estágio intermediário entre pseudo-hifa e hifa, que *in vitro* aumenta a capacidade de aderência e facilita a proliferação e a invasão da mucosa vaginal, causando a doença. Acredita-se que a penetração do tubo germinativo na mucosa intacta é facilitada por enzimas hidrolíticas, uma vez que foram isoladas de espécies de cândida, várias proteinases ácidas, dependentes de pH, que são otimamente ativas no pH vaginal normal de 4.0 a 4.5; no entanto não se sabe se o aumento da secreção dessas enzimas proteolíticas é consequência da transformação das pseudo-hifas em hifas, ou se é um fator independente, capaz de determinar qual paciente portadora assintomática irá ter vaginite. A produção de toxinas não é comprovada. A cândida prolifera em uma larga margem de pH e, no pH ácido, é capaz de proliferar em anaerobiose. (60,97,103)

Nas pacientes sintomáticas, predominam as formas de tubo germinativo e hifa, em número menor ou igual a 10^3 ou 10^4 / ml; há aumento da atividade proteolítica e as colônias tornam-se opacas (*switching colonies*) com a transformação do fungo, que se torna mais virulento, característica que passa a ser hereditária. Sobel (1989) considera que a germinação é o fator crítico de virulência na patogênese da vaginite por cândida. De acordo com Rodgers e Beardall (1999) há **4 fatores que podem contribuir para a virulência**: 1) o uso de antimicóticos, que são mais fungostáticos que fungicidas e então capazes de selecionar espécies resistentes de *Saccharomyces cerevisiae*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, 2) a transição dimórfica da *C. albicans* do blastosporo a hifa, 3) as expressões genotípicas e fenotípicas, que podem modificar a expressão dos antígenos de superfície e escapar da vigilância imunológica e 4) a secreção de proteinase. (60,97,103,104)

É desconhecido o mecanismo, ou mecanismos pelos quais a **colonização vaginal assintomática** - cujos dados de incidência variam largamente de 10 a 55% , com concordância de 15 a 25% e história natural desconhecida - transforma-se em **vaginite sintomática**. Considera-se que vários mecanismos envolvidos são dependentes do hospedeiro e por isso as manifestações clínicas variam de eritema, prurido a exsudação. Na vagina, a infecção é considerada hormônio-dependente porque pacientes na fase pré pubertal e na pós-menopausa são mais resistentes. Os **fatores do hospedeiro** que facilitam a colonização por *Candida sp.* ou a vaginite sintomática são: gravidez (aumento de 30% na taxa de colonização), diabetes mellitus descompensado, anti-concepcionais orais com alto conteúdo de estrogênio, terapia com corticóides, imunossupressores ou infecção pelo HIV, terapia anti-microbiana local ou sistêmica (aumento de 10 a 30% na taxa de colonização), roupas sintéticas apertadas, práticas higiênicas e aumento na frequência do coito. Esses fatores alteram o microambiente vaginal e o pH, aumentando a quantidade de nutrientes e alterando traços de metais como Zn, como também do CO₂ e disponibilidade de O₂. Os mecanismos naturais de resistência como a flora nativa e o

sistema imune da mucosa são removidos. A deficiência de Zinco é associada à diminuição da imunidade celular. A falência na resposta dos linfoblastos aos antígenos da *Candida sp.* é a alteração da imunidade celular mais comumente observada *in vitro*, na infecção oral. Na vagina, os antibióticos de largo espectro eliminam a flora nativa que normalmente representa uma resistência à colonização, p. ex. a interferência esteárica dos *Lactobacillus* à aderência e formação do tubo germinativo da *Candida sp.*, e a alteração da flora modifica ainda a competição pelos nutrientes e a ação das bacteriocinas. Na gravidez, o alto conteúdo de glicogênio é fonte de carbono para o crescimento da *Candida sp.* e o estrógeno aumenta a avidéz da célula epitelial. Admite-se então, que a vaginite sintomática desenvolve-se sob a ação de fatores que exacerbam a virulência da *Candida* ou é o resultado da perda dos mecanismos locais de defesa. (60,97,103)

A inflamação é devida à **invasão direta** do epitélio pelas hifas, o que é observado *in vivo*, *in vitro* e com microscopia óptica e eletrônica. A microscopia eletrônica de varredura mostra verdadeiros buracos no epitélio, causados pelas hifas, e também as pseudo-hifas. A invasão dos tecidos provoca eritema, edema, descamação das células epiteliais, e são vistos poucos leucócitos no Gram, gota a fresco e microscopia de varredura, embora sejam encontrados leucócitos na lâmina própria com a biópsia. Sobel (1989) descreve que a ausência de PMN é característica da vaginite por cândida: são escassos nos esfregaços corados com o Gram, em solução salina e à ME, mas a biópsia mostra leucócitos presentes na lâmina própria; Witkin (1991) também refere que os leucócitos “são tipicamente ausentes”. Acredita-se que os PMN e monócitos tem papel importante em limitar a infecção sistêmica e a invasão dos tecidos profundos pela cândida, mas não influenciam a colonização, nem previnem a invasão superficial da mucosa porque histologicamente, PMN e monócitos são escassos, no epitélio estratificado dos humanos; os PMN concentram-se na lâmina basal, mas não parecem apresentar quimiotaxia que os leve às camadas superficiais e a alcançar a secreção

vaginal. Linfócitos previnem a invasão da mucosa e as células T e macrófagos inibem a proliferação da cândida e a formação do tubo germinativo. (97,123)

Sobel (1989) refere ainda, que espécies de cândida podem também induzir á inflamação exsudativa por **hipersensibilidade ou reação alérgica**, especialmente nas pacientes com C V V recorrente idiopática e que talvez dependa do nível de IgE específica anti-cândida, por hipersensibilidade adquirida, em que as manifestações clínicas são mais evidentes na genitália externa. A **infecção vaginal recorrente por Candida** (R V V C) é definida como 4 ou mais episódios sintomáticos, comprovados, por ano, atribuídos mais à persistência da cândida do que re-infecção porque é encontrada a mesma espécie em 25 a 50% das recidivas; também não é relacionada à infecção do parceiro porque o tratamento do parceiro não reduz a taxa das recorrências. (60,97,103,123)

1.7.3 – Fundamentos básicos de imunologia da vagina e a contagem de leucócitos:

A imunologia da vagina despertou o interesse dos pesquisadores desde que se procura explicar como o sêmen infectado pelo vírus HIV depositado na vagina, infecta os linfócitos da mulher. A vaginite por *Candida sp.* por sua vez, é mais frequente em pacientes em uso de corticoterapia ou com AIDS, e outras infecções por cândida, como a oral, aparece em pacientes debilitados, com a imunidade celular deprimida ou imunossuprimidos, caracterizando a *Candida sp.* como um patógeno oportunista típico. (103,124)

O conhecimento que se desenvolve atualmente sobre os componentes imunes que agem na vagina e sobre o transporte de macromoléculas através do epitélio, tomam por base a ultra-estrutura da vagina humana descrita por Burgos et al. (1978) que estabeleceram definitivamente que o epitélio é composto por cinco camadas: superficial, transicional e intermediária, com dez fileiras de células cada uma e as camadas

parabasal e basal com uma ou duas fileiras de células que se apoiam sobre a lâmina basal ou membrana basal. O epitélio é permeado por uma rede de canais intercelulares por onde macromoléculas, fluidos e células migram da lâmina basal para o lúmen vaginal ou no sentido contrário. Na lâmina basal estão presentes macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células dendríticas ou células de Langhans, eosinófilos e mastócitos; raramente há polimorfonucleares neutrófilos - PMN. A **mucosa vaginal** é então constituída pelas **células epiteliais, células dendríticas tipo Langhans, macrófagos e células T**, e acredita-se que a vagina é um compartimento celular imunocompetente independente da imunidade sistêmica.. O ciclo menstrual influencia os canais epiteliais e a concentração de linfócitos, que são as principais células que migram pelos canais, em maior número na fase luteínica, mas estão presentes no lúmen vaginal apenas durante a menstruação; as células de Langhans e os macrófagos também migram pelos canais. (60,97,103,124)

Hill e Anderson (1992) quantificaram os leucócitos CD45, CD2, CD3, CD4 e CD8 em amostras padronizadas com $<2 \times 10^4$ leucócitos /mm, obtidas de 5 mulheres normais durante três ciclos consecutivos, após 48 horas de abstinência sexual, em um total de 60 amostras e concluíram que os leucócitos, incluindo linfócitos e macrófagos, não são frequentes na secreção cérvico-vaginal normal da mulher, exceto durante a menstruação.

Os achados das 60 amostras indicaram que: a) o aumento do número de leucócitos vaginais é consideravelmente $>2 \times 10^4$ / mm apenas durante a menstruação, menor na fase proliferativa do ciclo menstrual e constituídos por numerosos macrófagos e granulócitos, que são abundantes no endométrio humano, mas há poucos LT, LB ou plasmócitos; b) na fase peri-ovulatória e secretora há $< 10^4$ leucócitos; c) poucos linfócitos foram encontrados em qualquer estágio do ciclo menstrual; d) o lavado menstrual e da fase proliferativa mostrou os mesmos tipos de células, em número relativamente baixo e quase nenhum LB, que foram considerados leucócitos residuais. Em condições fisiológicas, o pH baixo inibe a função de defesa dos linfócitos mas não

tem nenhum efeito na fagocitose dos macrófagos, indicando que os fagócitos provavelmente tem papel ativo na defesa do hospedeiro no ambiente vaginal; a ativação e proliferação dos linfócitos é suprimida durante a menstruação, no meio do ciclo e após o coito. Witkin (1993) refere que o sêmen induz a grande aumento na concentração dos LT, macrófagos e PMN na cérvix, que migram para a vagina após o coito e, por sua vez o sêmen contém LT CD4, CD8, e células $\gamma\delta$, capazes de ativar a imunidade celular na vagina e aumentar a concentração local de citocinas e linfócitos vaginais; 4 horas após o coito, a proliferação dos linfócitos é suprimida.(56).

Infecções comuns (com exceção da BV), também resultam em acúmulo de macrófagos, linfócitos e granulócitos no lúmen vaginal, durante todos os estágios do ciclo menstrual, conhecimento que é ainda fragmentado, mas vem despertando interesse porque o pH vaginal nas infecções e o aumento do número das células infectadas e infectáveis representam alto risco para o HIV. Na infecção por fungos, Hill e Anderson (1992) detectaram $2 \text{ a } 3 \times 10^5$ leucócitos nas fases proliferativa e peri-ovulatória, constituídos em sua maioria por macrófagos e granulócitos; foram detectados linfócitos CD4, linfócitos com receptor de IL-2, poucos CD8 ($>10^4$) supressores / citotóxicos e nenhum LB; com uma semana de tratamento, desapareceram os leucócitos e as hifas. (56,97,103,110)

1.7.4 - A imunidade humoral na cérvix e vagina:

Rodgers e Beardall (1999) referem que os mecanismos protetores vaginais contra os patógenos são: a **imunidade da mucosa, o ciclo menstrual, as secreções reprodutivas bio-ativas, o pH baixo e os produtos metabólicos dos organismos comensais**. Considera-se como primeira linha de defesa, a imunidade local da mucosa cervical, capaz de produzir grande quantidade de IgA. A mucosa vaginal não tem glândulas nem epitélio secretor, o que não sugere que haja resposta imune local. No entanto, a presença de anticorpos IgG, de linfócitos e plasmócitos produtores de IgA na

lâmina basal, de IgM na inflamação aguda e também a presença dos canais que dão acesso ao lúmen, sugerem que a vagina é capaz de efetuar uma resposta localizada com anticorpos, permitindo que uma inflamação seja induzida na própria mucosa vaginal. IgG na secreção vaginal é um transudato do soro, enquanto que IgA é principalmente produzida no trato genital. Quando há a presença de alérgenos no lúmen vaginal, ou de antígenos da *Candida*, sua passagem pelos canais e sua ligação com IgE específica dos mastócitos na lâmina basal libera histamina, que induz à liberação de PGE 2 dos macrófagos; a PGE 2 bloqueia a ativação dos linfócitos por inibição da Il-2, o que pode explicar a vaginite alérgica na mulher suscetível. Anticorpos anti-*Candida albicans* IgA e IgG são encontrados no soro de 20 a 64% dos adultos normais, originados de outros órgãos além da vagina, podendo atingir o lúmen vaginal por difusão ou mecanismo de transporte dependente de receptor Fc. A ligação de IgA e IgG a espécies de *Candida* podem reduzir a aderência e prevenir a invasão, mas não parecem prevenir níveis baixos de colonização. Não são, portanto, anticorpos protetores, nem há aumento da incidência da vaginite por *Candida* nas mulheres com deficiência da imunidade humoral; ao contrário, há aumento da prevalência quando há deficiência da imunidade celular. (97,103)

1.7.5 - A imunidade celular na defesa do hospedeiro na vagina:

A imunidade celular é promovida por células mononucleares e linfócitos, incluindo células T citotóxicas, *natural killer*, macrófagos e os mecanismos de defesa mediados pelos granulócitos. Células T citotóxicas são CD8, ligam moléculas MHC classe I e eliminam células que contêm micróbios enquanto que células T-helper são CD4, ligam moléculas MHC classe II e ajudam a ativar respostas de outros leucócitos e macrófagos, através de medidores linfocinas, interleucinas e citocinas. (97,123,124,125)

As **células de Langhans**, a função dos **linfócitos $\gamma \delta$** , das **proteínas de stress**, da **PGE 2**, **IFN γ** e **β -endorfinas** são consideradas por Witkin (1991,1993) como achados

importantes para o conhecimento da imunologia da vagina e da infecção por *C. albicans*.
(123,124)

- a) As **células dendríticas de Langhans**, presentes no epitélio e na lâmina própria da vagina e da cérvice, fazem parte do conjunto de células apresentadoras de antígeno que são derivadas da medula óssea e ativam linfócitos T-helper; acumulam-se no foco inflamatório de modo semelhante aos macrófagos mas a população de células dendríticas e de macrófagos na vagina é ainda desconhecida. As células de Langhans expressam receptores Fc para IgG e C3 e antígeno de histocompatibilidade classe II, o HLA-DR. O HLA-DR permite à célula de Langhans apresentar antígenos ao LT-helper e iniciar a resposta imune; a ativação inicial da célula T, por sua vez, geralmente ocorre quando se reconhece um peptídeo estranho á molécula MHC, na superfície da célula-alvo - uma célula apresentadora de antígeno. Experimentalmente as células de Langhans são capazes de absorver proteínas exógenas administradas intra-vaginalmente e é possível que possam transportar antígenos para os linfonodos regionais e aí funcionarem como células apresentadoras de antígeno. (97,124)
- b) Os **LT $\gamma\delta$** migram através do epitélio na vagina de ratas e a maioria das células T $\gamma\delta$ associa-se às células da camada basal, indicando que tenham função imune na vagina; na mulher, sua concentração é menor que nas ratas. Os linfócitos $\gamma\delta$ que tem receptor de célula T (TCR) composto de cadeia α e cadeia β são diferentes da maioria dos LT circulantes, 95% dos quais possuem receptor de antígeno na superfície de cadeia α ou β e são LT $\alpha\beta$ (principal alvo do HIV). A maioria dos L $\gamma\delta$ não tem moléculas de superfície CD4 e CD8 co-receptoras de células T necessárias para a adesão e ativação, no que diferem dos L $\alpha\beta$ mas são CD3, no que são semelhantes aos L $\alpha\beta$; porque não são nem CD4 nem CD8, só reconhecem antígenos apresentados ou fragmentos antigênicos processados e não são células líticas,

capazes de responder a substâncias tóxicas e produtos bacterianos e virais; porque são CD3 são capazes de transmitir sinal, mesmo sem contato com o antígeno. Embora a função dos LT $\gamma\delta$ seja ainda pouco conhecida, os estudos vem sugerindo que promovem uma primeira linha de defesa contra as infecções na mucosas, com função de imunovigilância da superfície epitelial, sendo capazes de reconhecer mínimas alterações específicas na superfície das células epiteliais, mais do que os antígenos dos numerosos agentes microbianos; *in vitro* podem proliferar, liberar citocinas e ativar os $L\alpha\beta$. Essa função de imunovigilância das mucosas pelas células $\gamma\delta$ provavelmente está ligada ao reconhecimento dos determinantes antigênicos das **proteínas de stress**, antes denominadas proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), produzidas tanto por células de mamíferos como de bactérias que alteram sua expressão gênica quando há ameaças à sua vitalidade no meio ambiente. Em laboratório, nota-se aumento da temperatura de incubação antes da produção das proteínas durante o *stress*. Os microorganismos comensais da pele e mucosas mantém resposta imune potente à proteínas de *stress*. A infecção nos mamíferos, com a indução de febre e fagocitose, provoca a síntese preferencial das proteínas de stress em muitas bactérias e como consequência, a maioria dos humanos torna-se sensibilizada cedo, na vida. A capacidade de resposta, reconhecimento dos epítomos e a extensão da resposta às proteínas de *stress* são determinadas geneticamente e sequências de aminoácidos homólogos nas células de mamíferos e bactérias podem ser compartilhados em até 50%. Há hipótese de que as células $\gamma\delta$ tem capacidade de responder a qualquer infecção, sem a necessidade de reconhecimento de antígenos específicos e, nas infecções por patógenos intra-celulares, podem reconhecer proteínas de stress produzidas pelo hospedeiro. As células $\gamma\delta$ ativadas também produzem citocinas e recrutam fagócitos e células $\alpha\beta$ para o local da inflamação. No epitélio vaginal após infecção, muda a quantidade e as condições de

ativação das células $\gamma\delta$ em relação a diferentes patógenos, mas são ainda desconhecidas a sua capacidade de reconhecer proteínas de *stress* locais e a expressão destas proteínas pela microflora ou pelos patógenos vaginais. (123,124)

- c) Nas mulheres assintomáticas, em que a *Cândida* existe na vagina como comensal, o seu número é limitado pela imunidade celular e provavelmente por outros microorganismos e seus produtos. A *C. albicans* difere assim das bactérias, cujo número é regulado tanto pela imunidade humoral, como pela imunidade celular. Macrófagos e linfócitos T são as células que regulam o crescimento da *Cândida* na vagina. A **prostaglandina E2 (PGE 2)** liberada pelos macrófagos e o **interferon gama (IFN- γ)** pelo LT-helper (Th1) atuam na proliferação e morfogênese da *C. albicans*. A PGE 2 é um imunossupressor potente, age sobre o LT-helper aumentando o AMP-cíclico intra-celular, que estimula a proliferação do tubo germinativo, e também inibe a produção de IL-2, suprimindo a proliferação dos LT - isso representa a fase de sensibilização. Na presença de PGE 2 - é o IFN- γ produzido pelo LT-helper que inibe a formação do tubo germinativo. Por outro lado, a fagocitose da *Cândida* pelos macrófagos desloca os antígenos da sua superfície, que são conjugados com os antígenos de histocompatibilidade classe II; o LT-helper reconhece o complexo antigênico na membrana do macrófago, é ativado e produz IFN- γ ; o IFN- γ induz a fagocitose mais eficiente e induz o macrófago a liberar IL-1, o que estimula o LT-helper a liberar IL-2 - o maior estimulador da proliferação dos LT. Desse modo, quando há imunossupressão dominada pela PGE 2, a capacidade dos macrófagos e LT de inibir o crescimento da *Cândida* é limitada; quando há ativação da imunidade celular, aumenta a concentração local de IFN- γ e a sua capacidade de eliminar a *Cândida* é máxima. (123)
- c) Algumas evidências indicam ainda, a ação do neuropeptídeo **β -endorfina**, produzido pela hipófise anterior principalmente em condições de stress. A β -endorfina é um

imunomodulador que se liga a receptores de superfície do LT e dos macrófagos, ligação que induz à produção de PGE 2 e inibe a síntese de IFN- γ . Experimentalmente, concentrações fisiológicas de β -endorfina aumentam em até 160% em duas horas, a formação do tubo germinativo, somente em mulheres que ovulam. Além disso, a β -endorfina exerce seu efeito neurológico através de receptores opiáceos que provavelmente são semelhantes aos receptores de β -endorfina da *C. albicans*, sugerindo que um microorganismo unicelular eucariótico tenha capacidade de comunicar-se diretamente com o sistema nervoso e com o sistema imune dos humanos. A *C. albicans* pode desenvolver essa capacidade e possui ainda receptores que reagem com os hormônios esteróides em resposta às variações endócrinas. (123).

A hipótese de Witkin de que a redução da reatividade dos linfócitos T aos antígenos da cândida resulta do bloqueio da proliferação dos linfócitos por inibição da produção de IL-2, devido à ação da PGE 2 dos macrófagos, necessita ser confirmada. Anticorpos IgE ou um fator sérico seriam os responsáveis pela função anormal dos macrófagos. Outros autores como Wormley et al. (2001) salientam que a imunidade celular mediada pelos LT-helper do tipo 1 (Th1 CD4) é a principal defesa contra a infecção mucosa por cândida. Células Th1 secretam IL-2, IL-12, IFN- γ e atuam auxiliando células T citotóxicas e macrófagos. Admite-se que a resposta imune local depende mais da ativação das células T residentes dispersas na mucosa, do que da circulação de células sistêmicas efectoras CD3 e CD25 drenadas dos gânglios linfáticos para a vagina e requer adesão regulada e sequenciada aos receptores selectinas e integrinas expressos nos sítios de deposição de antígeno durante a inflamação. Os estudos experimentais sobre a infiltração de células T sistêmicas provenientes dos gânglios linfáticos na infecção por *Candida albicans* não são conclusivos. As α e β integrinas são importantes na infiltração dos linfócitos do trato

genital em resposta á infecção por *Chlamydia trachomatis*, mas, na infecção experimental por *Candida albicans*, a resposta dos LT residentes e do endotélio vaginal é modesta e insuficiente para ter algum efeito na infecção, talvez pela tolerância à cândida como comensal. (49,103,105,123,124)

1.7.6 - A relação entre a imunidade celular e o ciclo hormonal:

A resposta imune celular é considerada o maior mecanismo de defesa contra a infecção sistêmica ou mucosa por *Candida sp.* Os canais inter-epiteliais tornam o epitélio vaginal permeável a proteínas com diferentes pesos moleculares e então, antígenos solúveis podem estimular as células de Langhans, apresentadoras de antígeno e capazes de estimular os LT residentes na sub-mucosa a migrar para a superfície epitelial em resposta a fatores quimiotáticos. Na mulher, observa-se que a incidência de vaginite por cândida é mais comum na fase luteínica pré-menstrual; Witkin (1991) refere um estudo com três mulheres normais em que a resposta imune celular durante a fase luteínica foi a mais baixa e a capacidade do soro em favorecer a indução do tubo germinativo foi a mais alta; estudos subsequentes mostraram que os níveis de progesterona da fase luteínica (25ng / ml) inibem a proliferação de linfócitos induzida pela cândida 50% mais do que com níveis de progesterona da fase proliferativa (0,15 ng / ml). Os níveis de estrógeno não inibiram essa proliferação nem na fase proliferativa, nem na fase luteínica, mas talvez haja relação do estrógeno com a diminuição do número de macrófagos vaginais. A inibição da proliferação dos linfócitos mediada pela progesterona parece ser dependente dos macrófagos porque a resposta dos linfócitos é normal quando os macrófagos são removidos. A resposta imune à *Candida albicans* e também o desenvolvimento do fungo com a sua transformação em tubo germinativo são influenciados pelas condições hormonais da paciente, entretanto, há falta de uma resposta imune realmente protetora, capaz de evitar as recidivas e recorrências. (123,124)

1.8 - O ACHADO DE CLAMÍDIA NO ESFREGAÇO CÉRVICO-VAGINAL

Reconhecida em 1957, como agente etiológico de infecção no recém-nascido, infecção cervical da mãe e uretrite não-gonocócica do pai, a clamídia foi detectada com a coloração de Papanicolaou em 1970, por Naib, em esfregaços da conjuntiva e do colo uterino. Naib verificou a presença de vacúolos peri-nucleares com 0,5 a 3,0 um contendo inclusões, além de inflamação, e denominou os microorganismos agentes TRIC (*trachoma-inclusion conjunctivitis*), atualmente conhecidos como *Chlamydia trachomatis*, microorganismo sexualmente transmissível. Há apenas mais duas espécies: *C. pneumoniae* e *C. psittaci*, não sexualmente transmissíveis. (16,48,55)

1.8.1 - Principais características da clamídia e do seu ciclo reprodutivo:

A clamídia é o único patógeno que apresenta características tanto de vírus como de bactéria. Possui genoma circular que se assemelha a cromossomo bacteriano. Nas espécies de clamídia faltam os mecanismos de produção de energia metabólica, por isso não produzem ATP e dependem da energia fornecida pela célula do hospedeiro - é um parasita intra-celular obrigatório, multiplicando-se no interior da célula. A infecção e o ciclo reprodutivo inicia-se com o **corpúsculo elementar**, que é a partícula infectante estável, medindo 0,3 um, contendo um nucleóide eletrôn-denso e adaptada à existência extra-celular devido à sua parede rígida e resistente, semelhante à das bactérias Gram negativas, pelo conteúdo lipídico, mas constituída também por glicosaminoglican, que é responsável pela sua aderência à célula do hospedeiro. Em seguida à aderência ao receptor de membrana, a partícula é fagocitada mas não há fusão com os lisossomos da célula do hospedeiro e, no fagossomo, em 6 a 8 horas, o corpúsculo elementar é re-organizado, transformando-se em **corpúsculo reticulado** sem nucleóide e maior, com 0,5 a 1,0 um de diâmetro, que é a forma metabolicamente ativa e infectante. Acredita-se que o corpúsculo reticulado utiliza as mitocôndrias da célula do hospedeiro

para a síntese de DNA, RNA, proteínas e glicogênio. No vacúolo, aumenta de tamanho, multiplica-se por divisão binária, formando em algumas horas, a colônia de novos corpúsculos elementares ou **corpúsculos iniciais**, que aparece como **inclusão** no interior do vacúolo, aumentado de volume para acomodar o maior número de organismos no seu interior, em meio a matriz de carbohidrato. O ciclo se completa em 24 a 48 horas, a multiplicação cessa e as partículas vão ser liberadas com a ruptura do vacúolo para infectar novas células e recomeçar o ciclo. Tanto DNA como RNA estão presentes nos corpúsculos elementares e reticulares; os corpúsculos elementares contêm igual quantidade de DNA e RNA, com quase todo o DNA concentrado no nucleóide e maior quantidade de RNA nos ribossomos. Os corpúsculos elementares coram-se com o Giemsa em vermelho ou púrpura e os reticulares em azul. Massas de corpúsculos elementares tendem a ser maiores e granulares, as de corpúsculos iniciais aparecem homogêneas e uniformes e são comuns as inclusões contendo os dois tipos de partículas. O acúmulo de glicogênio da matriz de carbohidrato da *C. trachomatis* cora-se pelo lugol. A clamídia é rapidamente inativada pelo calor, perdendo completamente o seu princípio tóxico a 60°C durante 10 minutos, mas se mantém infectante até a -70°C ou -50°C durante anos; não são afetadas pela luz ultra-violeta e são resistentes à dessecação. (16,48,55)

1.8.2 - Os achados do exame citológico na infecção por clamídia:

Gupta et al, em 1979, demonstraram a presença de inclusões citoplasmáticas do tipo I, II e III em células cervicais exfoliadas e relacionou as inclusões com os estágios da infecção. Denominou a inclusão do estágio inicial, “corpos cocóides” ou do tipo I, encontrada em meio ao citoplasma de aspecto poroso, e com tendência a se localizar na região peri-nuclear; a inclusão do tipo II constituída por vacúolo de 2 u de diâmetro, único ou múltiplo, com borda bem definida e condensação basofílica ou eosinofílica central circundada por halo claro; a inclusão do tipo III foi relacionada com o estágio final,

quando os vacúolos intra-citoplasmáticos tornavam-se relativamente maiores apresentando condensação homogênea central e halo periférico, com aspecto de alvo, distendendo o citoplasma e deslocando o núcleo para a periferia. Nem Naib nem Gupta utilizaram os termos “corpúsculos elementares” e “corpúsculos reticulares”. Em 1985, Shiina descreveu as inclusões de modo mais compreensível em 5 tipos: dois tipos de inclusão em alvo, uma com formação de alvo central granular (GCTF) e a outra com alvo homogêneo (HCTF); dois tipos de grandes vacúolos com parede nítida e espessa, contendo inclusões múltiplas- a inclusão eosinofílica (EI) e a inclusão hematoxilínofílica (HI); o quinto tipo foi denominada por Shiina, inclusão nebular (NI), a qual não distendia o citoplasma, mas foi a única que apresentou coloração positiva para *Chlamydia trachomatis*. Em 1993, Henry et al. do National Naval Medical Center em Bethesda, constataram, com microscopia eletrônica em estudo de 15 pacientes positivas com ELISA, o conteúdo de numerosas clamídias nas inclusões do tipo nebular e, nas demais inclusões, apenas material amorfo ou estruturas semelhantes a microvilos. (48,55)

No esfregaço citológico também são descritas a inflamação com neutrófilos, ou cervicite muco-purulenta (MPC), histiócitos, linfócitos, e a metaplasia, atípias ou NIC. Os estudos em geral, falham em correlacionar as inclusões citoplasmáticas com infecção por clamídia comprovada pelos métodos de diagnóstico. Kiviat et al. (1985) correlacionando o exame citológico e a cultura de 77 casos de infecção por *C. trachomatis* verificaram que a maioria dos vacúolos não contém inclusões, que devem ser diferenciados os vacúolos degenerativos e que são encontradas inclusões em pacientes sem infecção por *C. trachomatis*. Em estudo subsequente, as inclusões foram identificadas por imunofluorescência em apenas ¼ das pacientes infectadas, representados por corpúsculos elementares extra-celulares. De acordo com esses autores, as únicas alterações epiteliais associadas com clamídia são a metaplasia reativa e atípica, alterações reativas das células endocervicais, e que devem ser observadas as seguintes características da inflamação: a) a presença de linfócitos transformados (imunoblastos e

células dos centros germinativos) no muco cervical, que foram quantificados de 0 a 10 com aumento de 400 vezes em pelo menos três campos adjacentes, acompanhados de linfócitos, histiócitos e plasmócitos; b) a presença de aumento do número de neutrófilos quantificados de 0 a 3+ até quando mais de 50% das células epiteliais estavam obscurecidas pelos PMN, em combinação com outras células inflamatórias ou MPC; c) a presença de 30 ou mais histiócitos com aumento de 400 vezes em pelo menos três campos adjacentes. Esses achados podem guiar o ginecologista ou o citopatologista na escolha de testes mais específicos para infecção; além disso a publicação refere que a relação entre a colposcopia, citologia e cultura não foi avaliada. Há outras citações, de persistência de vascularização aumentada e eritema na zona de transformação após tratamento, epitélio imaturo ou presença, na biópsia, de cervicite folicular com focos de infiltrado linfocitário e centros germinativos, o que nem sempre é confirmado. (23,55,63)

1.8.3 - A infecção por clamídia, suas formas clínicas, imunobiologia e a pesquisa de uma vacina:

A infecção cervical por *Chlamydia trachomatis* tem ocupado espaço na literatura médica por ter superado o número de casos novos de infecção por *Neisseriae gonorrhoeae* e por atingir mulheres jovens, especialmente associada a ectrópio porque ambas tem afinidade pelo epitélio colunar. Nos países industrializados, a *N. gonorrhoeae* pode ser isolada de 0,7 a 6% de todas as mulheres sexualmente ativas, em idade reprodutiva e aproximadamente ¼ das mulheres com cultura positiva para o gonococo tem também cultura positiva para clamídia. Nos países industrializados, a *C. trachomatis* pode ser detectada no colo uterino através de cultura, em 5 a 15% de mulheres assintomáticas em idade de reprodução e em 4 a 20% de todas as gestantes; outras referências apontam incidência variando de 8 a 40% . Calcula-se ainda, que 40% dos casos de salpingite aguda nos Estados Unidos e 60% dos casos de doença inflamatória pélvica na Suécia são causados por *C. trachomatis*, a qual parece ter a mesma

virulência que o gonococo quando atinge a trompa; a salpingite por clamídia é praticamente sempre precedida por cervicite, ou por endometrite, muitas vezes assintomáticas. Henry et al. (1993), em 11 de 15 pacientes, e Cavaliere et al. (1993) em São Paulo, verificaram a associação da infecção cervical por *C. trachomatis* com outras infecções sexualmente transmissíveis, este em 123 de 130 pacientes estudadas, 10 com infecção concomitante por HPV. (22,23,48,55)

A *Chlamydia trachomatis* é implicada como causa de cervicite muco-purulenta, uretrite em ambos os sexos, bartolinite, linfogranuloma venéreo (predominantemente masculino), DIP não gonocócica causada por clamídia - endometrite e salpingite com risco de gravidez ectópica pela formação da cicatriz pós-infecciosa, além do risco de morbidade e mortalidade peri-natal. O recém-nascido adquire a infecção durante a passagem pelo canal de parto, 15 a 20% manifestam a conjuntivite de inclusão, parecida com tracoma mas se resolve em uma a duas semanas; 10 a 20% dos recém-nascidos manifestam comprometimento do trato respiratório. Um aspecto que chama a atenção na infecção genital, é que frequentemente se estabelece um equilíbrio entre o hospedeiro e a clamídia, cujo resultado é a persistência e maior duração da infecção, que se torna crônica e com manifestações sub-clínicas. Altos títulos de anticorpos produzidos pelo hospedeiro podem ser detectados e permanecem elevados, mas não significam imunidade adquirida uma vez que pode ocorrer re-infecção, e, a presença dos anticorpos também pouco se relaciona com a presença das inclusões. A soronegatividade ajuda a excluir uma infecção genital, mas a frequência de soropositivos é tão alta, que raramente a determinação dos títulos de anticorpos tem valor na clínica ginecológica. Outro aspecto da infecção genital envolve a transmissão entre os parceiros: no homem, a clamídia é a primeira causa de UNG, responsável por cerca de 40% dos casos, seguida pela *N. gonorrhoeae* e *U. urealyticum* e pode ocorrer UNG por clamídia associada ao ureaplasma. Brunham et al. (1984) referem que a prevalência de *C. trachomatis* é maior

nas mulheres com cervicite muco-purulenta do que nos homens com uretrite não gonocócica.(16,18,19,23,48,55)

A pesquisa de uma vacina contra a clamídia em modelos animais vem contribuindo para a compreensão da patogênese e imunobiologia da doença. O recrutamento precoce de células dendríticas e LT-helper tipo 1 -Th1, para dentro da mucosa genital é observado na fase aguda e é decisivo para atenuar a infecção, evitando a doença inflamatória pélvica e suas complicações. Como a clamídia é um parasita intra-celular, os estudos que procuram esclarecer o papel da interação linfo-epitelial vem mostrando que a interação de Th1 com células infectadas e não infectadas ocorre via moléculas de superfície incluindo o produto dos gens dos complexos de histocompatibilidade, adressinas, co-receptores e co-estimuladores das moléculas de adesão. As moléculas de adesão ICAM-1, 2, 3 funcionam *in vitro*: a) na apresentação de antígeno, b) na ativação das células T, seu recrutamento e retenção nos tecidos e c) na citotoxicidade. Essas funções dependem da interação com receptores α -integrinas, o principal deles é o antígeno de função leucocitária, LFA-1, o que ocorre na defesa e em condições patológicas; ICAM-1 apresenta a mais alta afinidade pelo LFA-1. Células dendríticas móveis transportam antígeno através do epitélio estratificado da vagina e cérvix até os sítios de indução imune da mucosa e tem a capacidade de ativar a resposta primária das células T, especificamente Th1 contra vários antígenos, incluindo Ag anti-clamídia. A apresentação dos antígenos ao LT após a infecção, é associada ao aumento da expressão de ICAM-1 pelas células dendríticas levando à rápida ativação de Th1 e diminuindo a multiplicação da clamídia. Os Th1 por sua vez, secretam INF- γ que induz a expressão de ICAM-1 nas células epiteliais, aumentando a interação entre o epitélio e os LT. *In vitro*, o aumento da expressão de ICAM-1 pelas células em alvo infectadas por clamídia, aumenta a sua lise por LT CD8 específicos e células T citotóxicas. Entretanto, as flutuações hormonais do ciclo menstrual, que afetam a espessura do epitélio, a

distribuição de células dendríticas e a atividade endocítica das células epiteliais, suprimem a expressão de ICAM-1 e retardam a ativação de Th1, comprometendo a eficácia das vacinas. (61)

1.8.4 - Os métodos de diagnóstico da infecção genital por clamídia:

Os microorganismos clamídia apresentam antígeno compartilhado gênero-específico e os anticorpos contra esses antígenos podem ser detectados por fixação do complemento, ou mais comumente na prática, por imunofluorescência direta (IF ou DFA). Apresentam ainda, antígenos espécie-específicos (*serovar specific antigens*), também detectáveis por imunofluorescência e uma clamídia pode apresentar vários desses antígenos espécie-específicos. Já foram identificados 15 antígenos espécie-específicos de *C. trachomatis*: A, B, Ba e C, associados com tracoma endêmico; D e K associados com a infecção sexualmente transmissível; L1 ,L2 ,L3 associados com linfogranuloma venéreo. A cultura em células de Mc Coy também demonstra replicação diferente da *Chlamydia trachomatis* isolada dos três tipos de doenças e é o método *gold standard* para diagnóstico, embora complexa e cara. A detecção dos antígenos espécie-específicos por imunofluorescência , de material da conjuntiva e do colo uterino utiliza anticorpo monoclonal para o componente proteico da membrana da clamídia e é um dos métodos comercialmente disponíveis, com resultados referidos como semelhantes ao da cultura, com 80 a 90% de sensibilidade e 98 a 99% de especificidade. Outro método comercialmente disponível é a detecção dos antígenos lipopolissacarídeos gênero-específicos do corpúsculo elementar com o teste ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay* – EIA ou Chlamydiazyme), com sensibilidade referida de 60% ou 80 a 95% e especificidade 98 a 99%. Há ainda, os métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos por hibridização, teste de imunoperoxidase, PCR, LCR (em amostras de urina ou para detectar gonococo e clamídia em uma mesma paciente) que parecem

apresentar especificidade próxima de 100%, mas não tem definição da sensibilidade. (16,55,115)

A utilidade do teste de Papanicolaou para diagnosticar clamídia varia nas avaliações de diferentes autores, desde insensível a útil, contanto que sejam considerados os critérios morfológicos para infecção por *C. trachomatis* e a presença de células endocervicais no esfregaço. A sensibilidade do Pap-teste é referida de 5,3 a 38% ou até 95% e a especificidade de 4,5%, 75%, ou até 95,5%. Campos et al,1989, em São Paulo, encontraram índice de positividade de apenas 0,13% (40 casos de 30.000 amostras) e descreveram as alterações citológicas atribuíveis à clamídia; esse índice varia na literatura internacional de 8 a 43,8%. Em 1991, o Sistema Bethesda eliminou a *Chlamydia trachomatis* do seu léxico, considerando que a reduzida exatidão do diagnóstico deste microorganismo com o exame citológico já é reconhecida, mas o citopatologista não fica impedido de registrar o achado, se assim decidir. (19,22,23,48,83,117)

1.9 - O SISTEMA BETHESDA – TBS

O *workshop* promovido pela Early Branch and the Cytopathologic Section of the National Cancer Institute dos Estados Unidos da América do Norte, em Bethesda, Maryland, em 1988 e 1991, originou o The Bethesda System – TBS, o Sistema Bethesda. A primeira conferência realizada em 12 e 13 de dezembro de 1988 estabeleceu que era necessário padronizar a terminologia citológica e uniformizar o formato do laudo do esfregaço de Papanicolaou, para melhorar a comunicação com o clínico e fornecer as informações importantes por meio de terminologia padronizada. Os participantes aprovaram unanimemente três normas: a) o exame citopatológico é uma consulta médica; b) as classes de Papanicolaou não são mais aceitáveis por não comportar os conhecimentos da citopatologia moderna; c) o TBS é um guia para o exame citopatológico das amostras cérvico-vaginais. Um dos resultados mais importantes do TBS 1988 foi a inclusão da avaliação da amostra no laudo, e o Sistema Bethesda

introduziu também as novas especificações: Alterações reativas, Alterações celulares benignas, (BCC) Anormalidades nas células epiteliais, Atipia de células escamosas de significado indeterminado –ASCUS, Atipia de células glandulares de significado indeterminado –AGUS, Lesão escamosa intra-epitelial –SIL, Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau LSIL ou LGSIL, Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau- HSIL ou HGSIL. (102,109,117)

A nova terminologia causou tamanho impacto, que tornou necessária uma segunda conferência, realizada em 29 e 30 de abril de 1991. Foram convidados 182 citopatologistas, citotecnologistas e ginecologistas, na sua grande maioria norte-americanos e canadenses, que discutiram a experiência prática com o TBS, para que fosse feita a re-avaliação e revisão da classificação aceita na primeira conferência. Quase todos os participantes apoiaram a nova terminologia e por unanimidade, foram aprovadas a avaliação da amostra e a redução das alterações celulares pré-invasivas para dois grupos de classificação: de "baixo grau" (LSIL) e de "alto grau" (HSIL). As maiores controvérsias foram relacionadas com a inclusão das alterações causadas pelo vírus HPV como lesão de “baixo grau” (LSIL), devido às dificuldades encontradas em distinguir efeito citopático do HPV de formas moderadas de neoplasia intra-epitelial - NIC II. De maneira geral, o Sistema Bethesda de classificação recebeu, na segunda conferência, o apoio combinado da citopatologia acadêmica e dos laboratórios comerciais dos EUA. Com o surgimento das necessidades de modificações em algumas especificações, no TBS 1991, foram formados dois comitês: o Comitê Editorial com responsabilidade de sugerir emendas necessárias ao formato do laudo e da terminologia do TBS, baseadas nas críticas, apresentações científicas, avaliações dos laboratórios e comentários individuais; o outro, Comitê de Critérios, tinha a responsabilidade de definir os critérios morfológicos para diagnóstico e para a adequação da amostra. (79,102)

O formato geral para os laudos de laboratório, resultado das duas conferências (1988 e 1991), apresenta três **tópicos-chave**: 1) Adequação da amostra, 2)

Categorização geral e 3) Diagnóstico descritivo. As especificações para microorganismos e inflamação fazem parte dos tópicos Diagnóstico descritivo - **Alterações celulares benignas** - sub-item "**Infecção**": (79,117)

INFECÇÃO:

Trichomonas vaginalis

Fungos morfológicamente compatíveis com *Candida spp.*

Predominância de cocobacilos compatível com alteração na flora vaginal

Bactéria morfológicamente compatível com *Actinomyces spp.*

Alterações epiteliais associadas com herpes simplex vírus

Outros (*)

(*) HPV

ALTERAÇÕES REATIVAS associadas com:

Inflamação (inclui reparação atípica)

Atrofia com inflamação ("vaginite atrófica")

Radiação

Dispositivo intra-uterino (DIU)

Outro

No TBS 2001, realizado de 30 de abril a 2 de maio com cerca de 500 participantes, a opção geral foi de fazer poucas modificações ao que havia sido estabelecido no TBS 1991, para aguardar a discussão com a American Society for Colposcopy and Cervical Pathology no sentido de atender ao interesses de ambas as especialidades. As modificações foram: 1) a exclusão de "Satisfatório porém limitado", 2) a substituição de "Dentro dos limites da normalidade" por "Negativo para lesões intra-epiteliais ou malignidade", 3) retirada de "Alterações celulares benignas", mantendo-se "Infecção" e 4) foram eliminadas as conjecturas de "ASCUS - ou AGUS - favorece reativo". (9, 80)

Terminologia é definida como um sistema de termos usado em campo específico da ciência. Classicamente, a terminologia é desenvolvida por um grupo de especialistas que resumem conceitos que estão em uso há anos e evoluíram do conhecimento científico, do aumento da compreensão sobre a patogênese das doenças e das necessidades no atendimento ao paciente. Outra necessidade dos *workshops meetings* de Bethesda, é a de evitar implicações legais devido a falhas do teste de Papanicolaou,

especialmente pelas taxas de 20% de falso-negativos da citologia cervical, adequando-se à CLIA 88 que determina requisitos para a eficiência do teste e restrição do volume de exames a serem vistos por dia. No sentido de adequar-se às exigências científicas, há importantes obstáculos a serem vencidos na implementação da nova nomenclatura da Citopatologia. O primeiro deles é a falta de critérios morfológicos descritivos para as alterações celulares especificadas com o TBS, tendo-se somente fotomicrografias, como o recurso de que se dispõe para comparação. Além disso, há dificuldades de correlação entre os termos do exame citológico e histopatológico. Principalmente a linha divisória entre as alterações celulares em transformação como os diferentes graus de displasia, ou NIC, ou SIL não pode ser definida precisamente pela citologia, histologia ou tipagem viral. Nenhuma terminologia resolve esse problema, os pontos de corte arbitrários tem um caráter excessivamente subjetivo, demonstrado pelas variações entre os laboratórios e que são dependentes do observador. O outro obstáculo é a aceitação internacional, objetivo da Academia Internacional de Citologia (IAC)- de que uma classificação seja aceita em todo o mundo, objetivo considerado por membros da própria academia, como "desejável, mas pouco realista". Mesmo nos EUA, que propuseram o TBS oficialmente e sob o aspecto legal, um levantamento em 1994, enviado aos membros do College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in Cervico.vaginal Cytology, respondido por 1197 participantes, mostrou que 90% usavam o termo displasia, 89% usavam lesão escamosa intra-epitelial-SIL, 70% usavam neoplasia intra-epitelial cervical e mais da metade deles usavam todas as três nomenclaturas, independentemente da quantidade de exames. (64,100,109)

Na maioria dos outros países, os sistemas de saúde adotados ao longo da sua história, apresentam diferenças de tipo, estrutura, qualidade e disponibilidade de recursos. Os países de língua alemã usam classificação estabelecida pelas sociedades de Citologia da Alemanha, Austria e Suíça e preservam conclusões como p. ex. "aumento do núcleo de células escamosas sem atingir o grau de displasia" e "suspeito de

displasia moderada"; no Reino Unido, ASCUS corresponde a *bordeline nuclear changes* e é usado o termo "discariose" ao invés de displasia. Esses países mantêm suas próprias normas de diagnóstico e conduta com relação às pacientes em seus programas de *screening*, ou rastreamento em massa para prevenção do câncer cervical, mesmo tendo sido os americanos os pioneiros no uso do *Pap-test* para a prevenção do câncer ginecológico. E não se pode deixar de notar, na literatura médica, comentário afirmando que os países que tem "*screenings* oportunistas" mais facilmente aceitam as novas classificações, o que provavelmente se refere a países que não são do Primeiro Mundo, onde há falta de compromisso com a produção do conhecimento. (100)

O Sistema Bethesda, que o Brasil adotou não somente pela situação continental, pouco se estende no que se refere ao tópico "Infecção", incluído no "DIAGNÓSTICO DESCRITIVO". As modificações nas especificações referentes a microorganismos, que vem sendo feitas pelo TBS, quando comparadas com as floras codificadas de F1 a F11 da classificação da Universidade de Chicago, mostram que há um recuo no terreno da reação inflamatória. Não há uma determinação dos limites da coloração de Papanicolaou na identificação de microorganismos presentes na secreção vaginal e no esfregaço, nem há outra justificativa baseada no conhecimento atualizado de Microbiologia. A discussão sobre Inflamação ao exame citológico portanto, deverá acontecer nos EUA quando as discussões sobre Neoplasia chegarem a um bom termo, ou poderá não acontecer, dependendo de interesse dos especialistas americanos. A conclusão de Inflamação ou Infecção, que os patologistas e / ou citopatologistas brasileiros, diferente dos norte-americanos, acrescentam, nos laudos de Citologia Oncótica Vaginal, não é "um dos aspectos dos *screenings* oportunistas" referido na literatura - compreendendo-se que não é então conhecida a frequência dos patógenos vaginais na população - mas tem o objetivo de complementar o atendimento médico-ginecológico de rotina, de pacientes que não apresentam lesões pré-cancerosas ou câncer cervical e que representam a maioria

dos casos de qualquer amostra. A literatura consultada neste estudo demonstra isso. (79,80,100,117)

Desde a primeira conferência, o TBS vem fazendo algumas modificações nas especificações referentes a microorganismos ou agentes de infecção e houve acertos como a eliminação de "cocos" ou "bactérias cocóides", "bacilos" e "cocobacilos", que são denominações somente morfológicas, e a exclusão da clamídia devido problemas de diagnóstico com o exame citológico. Entretanto, a retirada dos *Lactobacillus* é incompatível com a manutenção do tópico AVALIAÇÃO HORMONAL, no relatório. As sucessivas mudanças na especificação referente à BV - "microorganismos morfolologicamente compatíveis com *Gardnerella spp.*" (TBS 1988), "predominância de cocobacilos compatíveis com alteração da flora vaginal" (TBS 1991), "alteração da flora compatível com vaginose" (TBS 2001) mostram que ainda não foram encontrados termos que estejam de acordo com a Microbiologia da BV e com a acuidade do exame citológico no diagnóstico dessa entidade. Foram mantidas a identificação de *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, *Actinomyces spp.*, "Outros" e vírus HSV além do HPV. (1,45,46,47,79,117,126)

Desde 1988 então, sucedem-se *workshop* de Bethesda, conferências e *tutorial* de especialistas internacionais da IAC- Task Force on Terminology, Diagnostic Cytology Towards the 21th Century. Entretanto, a proposta de linguagem do Sistema Bethesda não representa o fim das discussões sobre terminologia citológica das lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas e, encontrar um equilíbrio depende dos resultados obtidos com as pacientes. Em junho de 1992, o National Cancer Institute promoveu mais um *workshop* atendendo ao desejo de estabelecer normas de conduta para as pacientes mas, devido aos grandes obstáculos representados pela experiência limitada do TBS, comportamento incerto de LSIL e dados limitados sobre comprovações clínicas, além das controvérsias, os participantes sugeriram que as normas estabelecidas para conduta e exame de controle, apenas das pacientes classificadas como LSIL e ASCUS, fossem consideradas

interinas. Além de serem dirigidas especialmente às pacientes com lesões pré-neoplásicas, essas normas não foram alteradas pelo TBS 2001. (1,70,100).

Uma análise crítica rigorosa do Sistema Bethesda parece evidenciar que, mesmo com relação à prevenção e diagnóstico do câncer ginecológico, o estágio atual do Sistema Bethesda é o de que ainda está sendo testado: a nova nomenclatura não foi assimilada globalmente pelos *experts* norte-americanos, até agora pouco tem influenciado na conduta para a maioria das pacientes da clínica ginecológica e faltam estudos de correlação dos novos termos com a histopatologia. (64,70,89,100,109)

2.0 OBJETIVOS

2.0 - OBJETIVOS:

- 1- Verificar a prevalência dos microorganismos encontrados no material, avaliado por meio da correlação do exame de citologia cérvico-vaginal com exames microbiológicos.
- 2- Avaliar a acuidade diagnóstica do exame de citologia cérvico-vaginal e da coloração de Papanicolaou na identificação de microorganismos especificados por tópicos no laudo do exame citopatológico preventivo (Exame Citológico Cérvico-vaginal ou Exame de Citologia Oncótica Vaginal)
- 3- Aplicar o conhecimento da Microbiologia no relatório citopatológico dos processos inflamatórios e doenças sexualmente transmissíveis do trato genital inferior feminino.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.0 -MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material:

3.1.1 - Material para exame citológico:

Nosso material consiste de 10.064 exames de Citologia Oncótica Vaginal, realizados no período de abril de 1990 a dezembro de 1994, no Laboratório Sabin de Patologia Clínica, em Maceió - Alagoas. Os exames foram solicitados por ginecologistas, obstetras ou clínicos, pela existência de sinais e / ou sintomas ginecológicos, ou como exames de controle e prevenção do câncer ginecológico.

A maioria das pacientes era encaminhada para a colheita do material no laboratório e eram recomendadas a não fazer uso prévio de duchas, creme vaginal ou contato sexual antes da colheita, em período adequado para a obtenção de uma boa amostra. Outras pacientes eram encaminhadas com o esfregaço da secreção vaginal, previamente colhido pelo médico requisitante, em uma duas ou três lâminas fixadas e identificadas.

Para cada esfregaço citológico utilizava-se um formulário de Requisição para encaminhamento do exame citopatológico (Anexo I), onde constavam informações clínicas obrigatórias, além de informações adicionais consideradas importantes como gestação, tempo de gestação, pós-parto, exame pré-nupcial, lesão prévia por HPV ou terapia de reposição hormonal.

3.1.2 - Material para exame microbiológico:

No mesmo período, de abril de 1990 a dezembro de 1994, um total de 2.254 exames de microbiologia da secreção vaginal foram solicitados concomitantemente com o exame citológico.

Em 2138 casos (94,8%) os exames consistiam de culturas ou cultura para micoplasmas genitais; dentre estes, 1892 (88,4%) culturas foram comparadas neste estudo, com a codificação citológica para microorganismos e distribuídas em tabelas e gráficos. Em apenas 31 (1,3 %) pacientes foram diagnosticadas bactérias com a

bacterioscopia pelo Gram, não acompanhada da solicitação de cultura pelo clínico. A pesquisa de *Chlamydia trachomatis* com imunofluorescência foi requisitada em 85 (3,7%) casos, junto com a cultura.

O material para exame microbiológico era colhido simultaneamente com a amostra para exame citológico no laboratório, ou eram um ou outro, ou ambos eram enviados já colhidos pelos ginecologistas.

Os exames microbiológicos vinham acompanhados de uma ficha de requisição que incluía dados clínicos relevantes (Anexo 2).

3.2 - Método:

3.2.1 - Obtenção e processamento do material para exame citológico:

O esfregaço citológico foi obtido por via endovaginal, com o uso de espéculo e espátula de Ayre's e para cada caso, foi realizada uma única preparação citológica: da parede vaginal ao nível do fundo de saco posterior e da ectocérvice e do orifício externo do colo mediante rotação de 360° da espátula. A partir de 1993, a colheita da endocérvice passou a ser realizada com o uso de *cytobrush*. Os três esfregaços foram colocados na lâmina, com a secreção vaginal junto à borda fosca e o raspado cervical e endocervical ao longo da lâmina, sendo imediatamente fixados com polietileno-glicol. (Carbowax). Os esfregaços já colhidos pelos ginecologistas foram recebidos em lâmina única, em duas lâminas ou esfregaços com colheita tríplice, também já fixados com Carbowax e alguns com álcool-éter.

Se o esfregaço obtido apresentava-se inadequado para o exame microscópico, as pacientes eram solicitadas a fazer nova colheita no laboratório. Foram excluídos deste estudo os casos de esfregaço insatisfatório por material insuficiente ou mesmo ausente, como pode ocorrer p. ex. em pacientes virgens ou na pós-menopausa, como também os casos de pacientes com o esfregaço representado apenas por hemorragia, como pode

ocorrer p. ex., em ectrópio extenso. Outros exames não foram incluídos na amostra por extravio das anotações.

Os esfregaços citológicos, depois de colhidos e fixados, foram corados de acordo com a técnica de Papanicolaou e cada lâmina coberta com lamínula de 24 x 32 mm, montada com entelan, para exame microscópico.

O relatório citopatológico continha informações sobre a ausência ou presença de neoplasia, ou de lesão pré-neoplásica, e sobre a reação inflamatória ou ocorrência de inflamação ou infecção.

3.2.2 - Obtenção e processamento do material para exame microbiológico:

A colheita era realizada também com o uso de espéculo e *swab* descartável e o material colocado em tubo de ensaio que foi previamente submetido à secagem na estufa a 100°C e contendo solução salina. O material era obtido da cérvix após a remoção de excesso de muco e, dependendo da justificativa do clínico, era obtido material do fundo de saco vaginal posterior. Quando a amostra já havia sido colhida, o *swab* era recebido em tubo de ensaio com o meio de transporte de Stuart. Para a pesquisa de *Chlamydia*, o material para imunofluorescência (.Biolab-Mérieux) era colhido depois da remoção do muco, introduzindo-se o *swab* no canal endocervical e girando-o para ambos os lados. Em todos os casos foi feita a microscopia a fresco para a identificação de tricomonas e monília e houve casos em que somente o T+M era solicitado pelo clínico. Para a coloração pelo Gram, o esfregaço era feito com leves movimentos circulares sobre a lâmina. Com o Gram podiam ser identificadas bactérias como a *G.vaginalis*, *Mobiluncus sp.*, *Neisseriae gonorrhoeae* ou outros.

A semeadura nos meio de cultura era feita com o *swab* do meio de transporte em placa com ágar sangue humano desfibrinado a 5% e em Mac Conkrey, em seguida estirado com alça de platina. O *swab*, novamente retirado do tubo com o meio de

transporte ,nos casos em que era solicitado pesquisa de micoplasmas, era semeado na placa com o meio A7 (Mycogen).

Após o período de incubação dos meios, era verificado o crescimento das colônias e realizados testes com o material do meio de cultura, primeiramente submetido à prova da catalase, para diferenciação entre estafilococos e estreptococos. Os organismos catalase-positivos eram identificados como estafilococos e submetidos à DNASE . Após o teste da DNASE, era feito o teste de coagulase, ou Staphytest, ambos positivos para o *Staphylococcus aureus* . Os organismos catalase-negativos eram identificados como estreptococos e verificada a presença de alfa, beta ou gama-hemólise (ausência de hemólise). Na presença de alfa-hemólise, a identificação de enterococos era feita, após a reação negativa à optoquina, pela reação positiva ao NaCl a 6,5% positiva à bile esculina. Na presença de beta-hemólise, a identificação de enterococos era feita, após a reação negativa à bacitracina, pela reação positiva ao NaCl e positiva à bile esculina. Os microorganismos com reação negativa ao NaCl eram submetidos ao Camp test para detecção da positividade pelo *Streptococcus agalactiae*. Na ausência de hemólise (gama-hemólise), a identificação do enterococo era feita com a reação positiva ao NaCl e positiva à bile esculina. O teste da bile esculina foi também utilizado para detectar estreptococos do grupo D não- enterococos, ou *Streptococcus spp*, pela reação positiva à bile esculina e negativa ao NaCl.

Com relação aos micoplasmas, após a incubação a 37°C por 48 horas no meio A7, foi feita a avaliação semi-quantitativa por contagem de colônias na placa, com objetiva de 10 vezes, verificando-se o número de colônias de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealiticum*, considerando-se exacerbada a quantia de 50 UFC (unidade formadora de colônias) em um quadrante de placa de Petri de 6 cm de diâmetro, o que equivale a 105 organismos e estabelece sua etiopatogenicidade.

Os aeróbios Gram negativos, como a *Escherichia coli*, e os gêneros *Klebsiella*, *Proteus*, foram identificados pelas provas bioquímicas da lisina, SIM, uréia, TSI e indol.

Os relatórios de exames microbiológicos atendiam a uma ou mais de uma das seguintes requisições clínicas: Cultura da secreção vaginal (que inclui T+M), Cultura para micoplasmas genitais, Pesquisa de clamídia (com imunofluorescência), T+M ou Pesquisa de tricomonas e monília, ou somente bacterioscopia.

3.3 - Avaliação da flora (F) ao exame citológico:

Para a avaliação dos microorganismos foi utilizada a classificação, ou codificação, de Bibbo et al.(1976) adotada à época, pelo SUS - Sistema Único de Saúde - e que estratifica a flora em onze categorias:

F1 - *Lactobacillus sp.*:

A flora constituída por lactobacilos, antes denominados bacilos de Doderlein, é representada na coloração e Papanicolaou, por quantidade variável de bacilos de tamanho médio, por flora exacerbada de bacilos pequenos ou, em outros casos, de bacilos longos.

F2 - Flora mista :

É constituída por lactobacilos e presença de proliferação variável de bactérias que se coram levemente, não apresentam a forma de bacilos mas não podem identificadas com segurança, ao exame citológico.

F3 - Flora de cocos ou bactérias "cocóides" :

A presença de cocos com disposição linear permite reconhecê-los como estreptococos ao exame citológico , mas não podem ser especificados. Outros possíveis cocos não são reconhecidos com facilidade nem podem ser especificados. A morfologia "cocóide" também não especifica nem cocos nem micoplasmas. A proliferação bacteriana cora-se levemente com o Papanicolaou e pode ser discreta, ou mais ou menos intensa.

F4 - *Gardnerella vaginalis* :

De acordo com Gardner e Dukes (1954), e Giacomini (1997), o esfregaço citológico apresenta o fundo coberto por intensa proliferação bacteriana levemente basofílica, formando em vários campos, espaços claros entre as células epiteliais e também cobrindo células epiteliais que podem ser reconhecidas como *clue cells* ou células- guia.

F5 - *Leptotrix vaginalis* :

Tipicamente são maiores que lactobacilos longos, podem estar encurvados, ou mesmo serem vistos como uma letra ômega. Em alguns esfregaços, é difícil diferenciá-los de lactobacilos longos. Podem ser diferenciados de *Actinomyces spp.* porque não formam tufo.

F6 – *Trichomonas vaginalis* :

As tricomonas apresentam-se menores ou maiores, íntegras ou degeneradas, em meio às células epiteliais descamadas e à inflamação moderada ou intensa, poucas vezes leve. O diagnóstico citológico somente é possível quando estão presentes tricomonas íntegras, com núcleo conservado.

F7 – *Chlamydia trachomatis* :

É raramente encontrada em células endocervicais ou metaplásicas. Apresenta-se sob a forma de um ou mais corpúsculos dentro de vacúolo intra-citoplasmático. Quando essas células não estão presentes no esfregaço citológico, deve ser impossível identificar a clamídia.

F8 - *Candida sp.* :

A cândida é vista sob a forma de esporos arredondados acidófilos, aproximadamente do tamanho de um lóbulo do núcleo de neutrófilo, sob a forma de pseudo-hifas, um pouco maiores que os esporos, alongadas ou semelhantes gotas de água, e ainda, sob a forma de hifas, que se assemelham a bastões de comprimento variável, acidófilos.

F9- Vírus HPV, HSV :

São parasitos intra-celulares e as formas microscópicas típicas do HPV são o coilócito, as atipias nucleares, ou as demais alterações descritas por Schneider, em 1987. O HSV produz efeito citopático característico, descrito como “olho de coruja”.

F10- Flora ausente:

Nota-se ausência de flora principalmente em esfregaços atróficos ou de virgens, em esfregaços hemorrágicos ou algumas vezes, em mulheres em idade reprodutiva com inflamação intensa e em mulheres no pós-parto.

F11- Flora não classificada:

Pode ser representada por proliferação de pequenos bacilos pequenos, por uma proliferação mais ou menos intensa de bactérias que não podem ser identificadas pela coloração de Papanicolaou, presentes no fundo do esfregaço ou em meio às células epiteliais, ou a flora é escassa.

3.4 - Avaliação da intensidade da inflamação ao exame citológico:

Pela falta de padrões de contagem de células inflamatórias no esfregaço citológico, e das falhas na correlação das alterações das células epiteliais com a reação inflamatória, adotamos uma avaliação simplificada acerca da intensidade da reação inflamatória nesta amostra.: as inflamações **leves** apresentavam apenas pequenos desvios do padrão normal do esfregaço em relação à data do ciclo como pseudo-eosinofilia das células epiteliais e poucos leucócitos adicionais (a BV não foi classificada como inflamação leve em nenhum esfregaço, por tratar-se de infecção bacteriana); as inflamações **moderadas** eram de intensidade intermediária e as inflamações **intensas** corresponderam aproximadamente ao padrão em que 50% das células epiteliais, ou mais, estavam obscurecidas por neutrófilos e piócitos, padrão definido pelos Microbiologistas no esfregaço corado com o Gram.

3.5 - Estudo estatístico:

Para a computação geral dos dados foi utilizado o programa Epi-Info, que determinou as características gerais da amostra (10.064 casos).

As tabelas confeccionadas para cada grupo de flora (F1 a F11) foram expressas em gráficos construídos com a planilha Excel da Microsoft.

O estudo estatístico realizado a partir das tabelas de frequência 7 e 8, utilizou o pacote estatístico Primer of Biostatistics, Versão 4.02 de Stanton A. Glantz, Mc Graw-Hill Company Inc.

4.0 RESULTADOS

4.0- RESULTADOS:

4.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA:

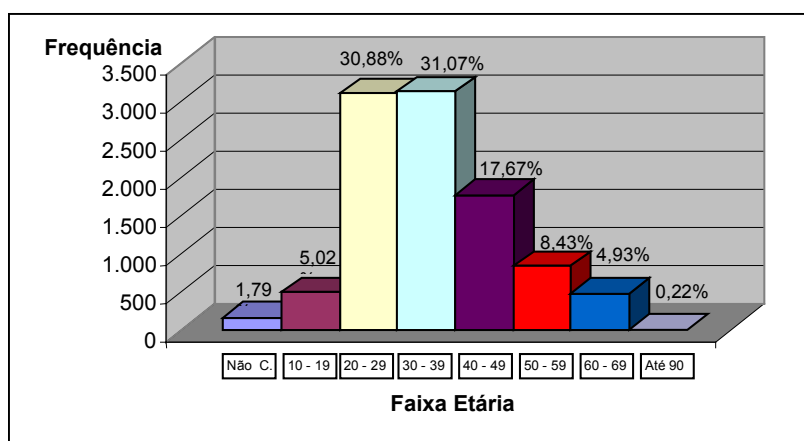
A amostra é representada por um total de 10.064 exames citológicos cérvico-vaginais de pacientes que compareceram ao laboratório, no período de abril de 1990 a dezembro de 1994. Em 2.169 casos (21,5%), a requisição do exame citológico foi acompanhada de solicitação de culturas e / ou bacterioscopias.

A distribuição por faixa etária mostra que 6.235 pacientes (61,9%) tinham de 20 a 39 anos de idade, portanto, em fase de vida sexual ativa e idade reprodutiva. (tabela 1, gráfico 1)

Tabela 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SUBMETIDOS A EXAME CITOLÓGICO, DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA:

Faixa Idade	Frequência	Percentual
Não consta ou <10	180	1,79%
10 – 19.	505	5,02%
20 – 29.	3.108	30,88%
30 – 39.	3.127	31,07%
40 – 49.	1.778	17,67%
50 – 59.	848	8,43%
60 – 69	496	4,93%
Até 90	22	0,22%
Total	10.064	100,0%

Gráfico 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SUBMETIDOS A EXAME CITOLÓGICO, DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

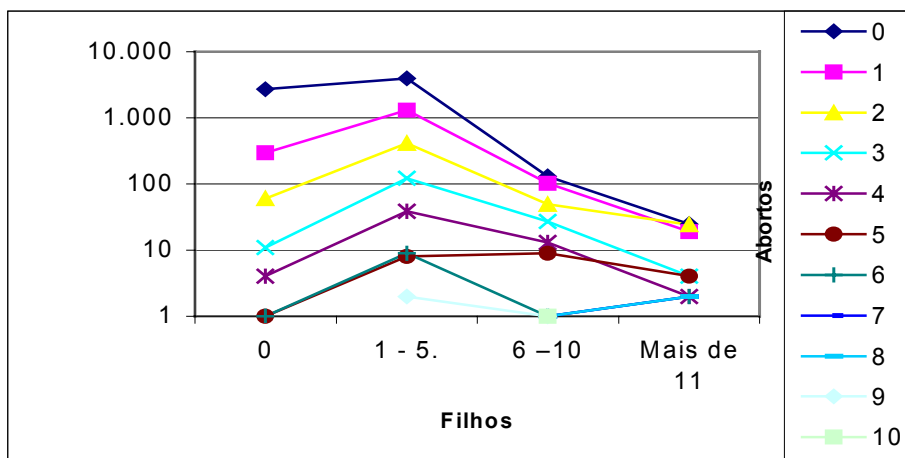


Um total de 5.840 (58,0%) pacientes tinham de 1 a 5 filhos e o número de abortos variou de 1 (1.724 casos) a 10 (1 caso), tendo sido verificada uma relação inversa entre o número de filhos e o número de abortos. (tabela 2, gráfico 2)

Tabela 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO Nº DE FILHOS E DE ABORTOS

Nºde filhos	Nº de abortos												Total
	-	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
N/C	735	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	735
0	0	2.694	298	60	11	4	1	1	0	0	0	0	3.069
1 – 5.	0	3.940	1.305	414	123	39	8	9	0	0	2	0	5.840
6 –10	0	131	102	49	27	13	9	1	1	1	1	1	336
Mais de 11	0	25	19	24	4	2	4	2	2	2	0	0	84
Total	735	6.790	1.724	547	165	58	22	13	3	3	3	1	10.064

Gráfico 2: DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM RELAÇÃO AO NUMERO DE FILHOS E DE ABORTOS:



Podemos observar que o gráfico confirma a relação inversa entre número de filhos x número de abortos.

A distribuição dos casos de acordo com as informações clínicas pode ser vista na tabela 3. Essas informações foram obtidas em 6.225 casos, de um total de 10.064 exames.

Tabela 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE ACORDO COM OS DADOS CLÍNICOS EM DE 6.225 CASOS (DE UM TOTAL DE 10.064)

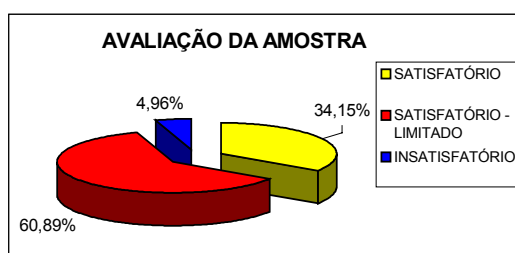
Nuliparidade	3.426	34,04%
Gravidez	261	2,59%
Pós-parto	153	1,52%
Anti-concepcionais	861	8,56%
Menopausa	864	8,59%
Histerectomia total ou parcial	660	6,56%

A avaliação da amostra cérvico-vaginal pode ser vista na tabela 4, gráfico 3. Resultou em 3.437 esfregaços satisfatórios (34,1%), 6.128 satisfatórios porém limitados (60,8%) e 499 insatisfatórios (4,9%), de acordo com o Sistema Bethesda (TBS),1991.

Tabela 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS ESFREGAÇOS CÉRVICO-VAGINAIS DE ACORDO COM A AVALIAÇÃO DA AMOSTRA DO SISTEMA BETHESDA,1991:

Ins.	Sat	Sat-L	Total
499	3437	6128	10.064

Gráfico 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ESFREGAÇOS CÉRVICO-VAGINAIS DE ACORDO COM A AVALIAÇÃO DA AMOSTRA PELO SISTEMA BETHESDA, 1991:



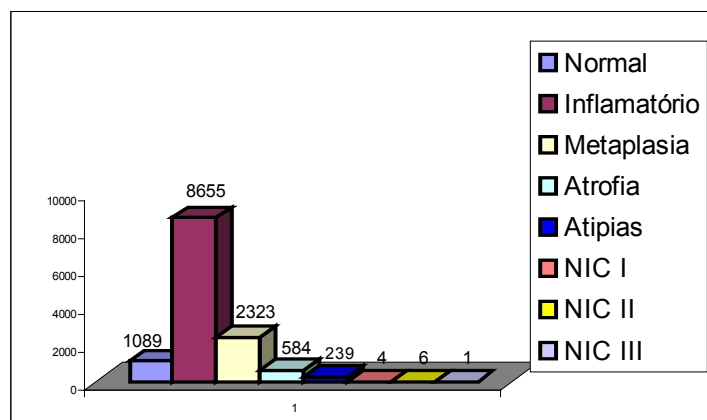
Em 1.089 exames citológicos (10,8%), o esfregaço apresentava-se normal para a data do ciclo ou idade da paciente. Os esfregaços que apresentavam inflamação e / ou infecção totalizaram 8.655 casos (85,9 %), e 11 (0,1%) neoplasia intra-epitelial cervical

(tabela 5 e gráfico 4). Muitas pacientes apresentavam mais de uma dessas alterações mencionadas.

Tabela 5 - ACHADOS DO EXAME CITOPATOLÓGICO EM 10.064 CASOS:

Normal	1089	10,82%
Inflamatório	8655	86,00%
Metaplasia	2323	23,08%
Atrofia	584	5,80%
Atipias (OMS)	239	2,37%
NIC I	4	-
NIC II	6	-
NIC III	1	-

Gráfico 4 - ACHADOS DO EXAME CITOPATOLÓGICO EM 10.064 CASOS



Os exames microbiológicos realizados foram, por ordem de frequência: cultura, correspondendo a 2.138 casos (94,8%), imunofluorescência para clamídia em 85 casos (3,7%) e bacterioscopia em 31 (1,3%).

Como se pode notar, ao exame da tabela 6 e gráfico 5, culturas acompanhadas de bacterioscopias (T+M) foram solicitadas na maior parte dos casos (2.169), porém bacterioscopias isoladas foram muito pouco requisitadas (31). Os 2.138 casos em que

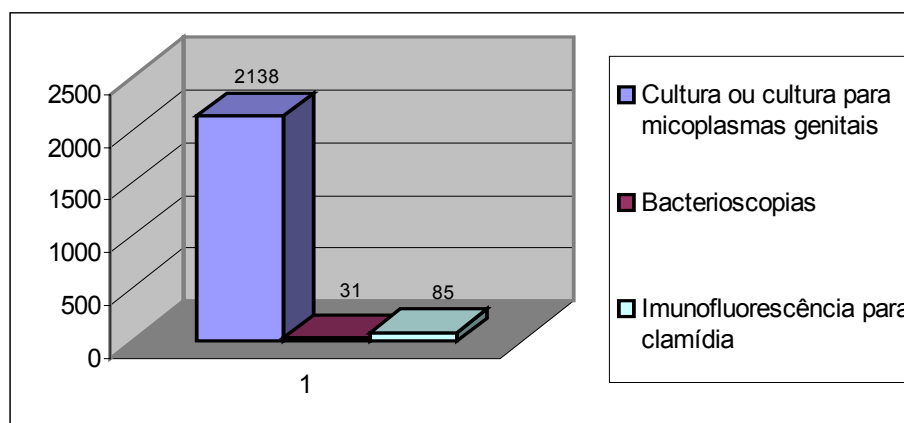
foram realizadas culturas, incluíam, em parte da amostra, a pesquisa de micoplasmas genitais

Tabela 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS

REQUISITADOS PELOS CLÍNICOS:

Cultura, cultura para micoplasmas genitais	2138	94,85%
Imunofluorescência para clamídia	85	3,77%
Bacterioscopias	31	1,38%
TOTAL DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS	2254	100,0%

Gráfico 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE EXAMES MICROBIOLÓGICOS REQUISITADOS PELOS CLÍNICOS:



Os exames microbiológicos foram realizados no laboratório, por médicos especializados e, por orientação do laboratório Sabin, o resultado do(s) exame(s) microbiológico(s) aguardava o resultado do exame citológico, ou vice-versa. Os dois exames somente podiam ser liberados conjuntamente e compatíveis um com o outro, a fim de que não houvesse discrepâncias no diagnóstico de inflamações e infecções cérvico-vaginais. Na identificação de microorganismos, o exame microbiológico contribuiu para acrescentar p. ex. esporos de *Candida sp.* ao exame citológico, nos casos em que havia dúvidas ou mesmo, os que não eram vistos no material colhido para o exame de Papanicolaou. Por outro lado, o exame citológico contribuiu com informações sobre

esfregaços em que havia uma provável infecção a ser investigada e era necessário que a paciente realizasse a cultura da secreção vaginal, ou cultura para micoplasmas genitais, p. ex. nos casos com BV e exsudato e casos de inflamação purulenta.

4.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS FLORAS MAIS COMUNS:

As tabelas 7 e 8 demonstram as dez floras mais prevalentes ao exame citopatológico e microbiológico, respectivamente. Como se pode notar, as três mais prevalentes (*Lactobacillus sp*, *Candida sp*. e *Gardnerella vaginalis*) são coincidentes no exame citopatológico e microbiológico.

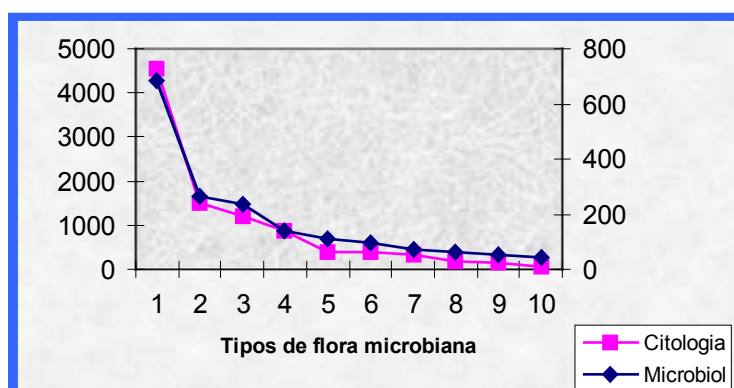
Tabela 7 - FREQUÊNCIA DOS DEZ TIPOS DE FLORA MAIS COMUNS AO EXAME CITOPATOLÓGICO

<i>Lactobacillus</i> e citólise	4.550	45,21%
Cândida - lactobacilos	1.519	15,09%
<i>Gardnerella</i>	1.194	11,86%
Mista	866	8,60%
“Cocóide”	380	3,78%
Não classificada	377	3,75%
Lactobacilos - leptotrix	325	3,23%
Ausente	169	1,68%
<i>Leptotrix</i>	143	1,42%
Mista - cândida	70	0,70%

Tabela 8 - FREQUÊNCIA DOS DEZ TIPOS DE FLORA MAIS COMUNS AO EXAME MICROBIOLÓGICO

<i>Lactobacillus</i>	684	31,54%
Cândida - lactobacilos	265	12,22%
<i>Gardnerella</i>	234	10,79%
Lactobacilos - ureaplasma	142	6,55%
Negativa	109	5,03%
Clamídia	94	4,33%
<i>E. coli</i>	70	3,23%
Ureaplasma	64	2,95%
Lactobacilos - estafilococos	53	2,44%
Lactobacilos - leptotrix	43	1,98%

Gráfico 6 - TRAÇADOS DA COMPARAÇÃO DAS DUAS SÉRIES INDEPENDENTES, REFERENTES AOS DEZ TIPOS DE FLORA MAIS COMUNS AO EXAME CITOLÓGICO E AO EXAME MICROBIOLÓGICO:



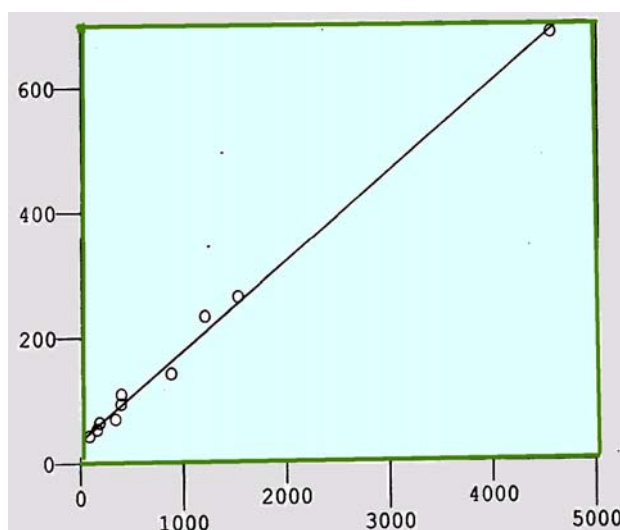
No eixo Y esquerdo os algarismos indicam os casos diagnosticados pela citopatologia, no eixo direito os diagnósticos dados pelo sub-set dos casos em que foi feita a cultura bacteriana. No eixo X os números seguem a seqüência das indicações de flora das tabelas 7 e 8.

O gráfico 6 mostra que as curvas de freqüência correm paralelamente entre si, em patamares diferentes. Os estudos de correlação entre as duas séries (Citologia e

Microbiologia) resultaram em valor de r de 0,9975, i.e., são virtualmente iguais. O valor máximo possível é 1 (correlação linear perfeita positiva). Em nosso material o valor de r se afastou da correlação perfeita positiva por 0,0025, isto é, milésimos, virtualmente uma correlação perfeita. O valor de P foi menor que 0,001.

Na comparação das categorias com maior número de casos (*Lactobacillus sp.*+ citólise, *Candida sp.*+ *Lactobacillus sp.* e *Gardnerella vaginalis*), r foi de 0,9997, diferindo da correlação perfeita positiva em 0,0003, i.e., em décimos-milésimos, uma correlação ainda maior. O valor de P foi de 0,01.

Gráfico 7 - REGRESSÃO LINEAR MOSTRANDO ADERÊNCIA VIRTUALMENTE PERFEITA ENTRE AS CURVAS COMPARATIVAS PARA OS DIAG -NÓSTICOS DE FLORA PELO EXAME CITOLÓGICO E PELO EXAME MICROBIOLÓGICO:



O cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (R_s) resultou em $R_s = 1$ (o máximo possível; -1 o mínimo) demonstrando uma correlação positiva perfeita, sendo $P < 0,001$

Esses resultados mostram que as duas curvas são iguais, (gráfico 7) i.e., houve correspondência perfeita entre a caracterização da flora pelo exame citopatológico e a obtida pela cultura bacteriana.

4.3 – ANÁLISE DOS CASOS SUBMETIDOS A EXAME CITOLÓGICO E MICROBIOLÓGICO (2.169):

A predominância de *Lactobacillus*, que corresponde à codificação F1, foi verificada em um total de 4.550 casos (45,2%), dentre os quais 320 (7,0%) esfregaços citolíticos. A cultura identificou apenas *Lactobacillus* em 684 casos (15,0%).

Houve associação de lactobacilos com outros agentes como a bactéria *Leptotrix* em 325 casos (3,23%).

Dentre os casos classificados como flora formada por *Lactobacillus sp.*, tivemos 22 casos (0,4%) positivos para clamídia pela imunofluorescência.

Os *Lactobacillus* também constituíram a flora mista (F2) em 866 (8,6%) casos. Desse total, em 313 (36,1%) foram também realizados exames microbiológicos assim distribuídos: 289 (33,3%) culturas ou cultura para micoplasmas genitais, 7 bacterioscopias e 17 (5,4%) imunofluorescências positivas para clamídia.

O resultado das culturas (tabela 9, gráfico 8) mostrou os *Lactobacillus* associados com estafilococos em 53 casos (18,3%) representados pelo *S. aureus*, e com estreptococos em 37 (12,8%), representados pelo *Streptococcus spp.*, que é o estreptococo do grupo D não enterococo, e pelo *Streptococcus sp.*

Houve maior frequência da associação dos *Lactobacillus* com os micoplasmas genitais : o *Ureaplasma urealyticum* em 142 casos (49,1%), *Mycoplasma hominis* em 3 (1,0%) e em 9 casos (3,1%) estavam presentes cocos associados a micoplasmas. A flora mista visualizada ao exame citológico foi mais frequentemente representada pela exacerbação dos micoplasmas genitais (50,1%) do que infecção por cocos (31,1%). Em 16 casos a cultura identificou apenas *Lactobacillus* e 1 teve resultado negativo (indicando necessidade de repetição ou pesquisa de micoplasmas).

A flora mista foi ainda representada pela associação dos *Lactobacillus* com a *Escherichia coli*, demonstrada com cultura em 17 casos (5,8%) e em 8 (2,7%) havia também a exacerbação de micoplasmas genitais. Foram ainda detectados pela cultura, outras bactérias patogênicas associadas aos *Lactobacillus* : *G.vaginalis*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp.*, *Mobiluncus* e *Corynebacterium* com *S. aureus*, ao todo 11 casos (3,8%).

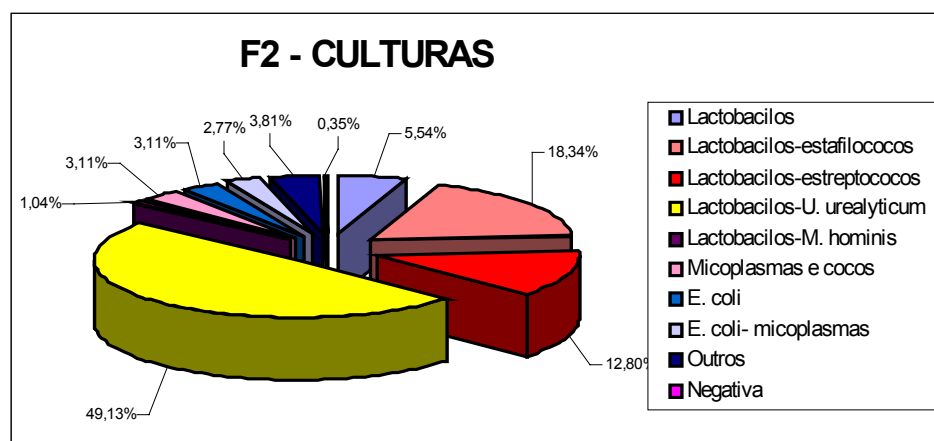
A correlação da citologia com a cultura mostrou até 3 bactérias por esfregaço e, em 2 casos, até 4 bactérias.

A bacterioscopia identificou: 1 coco Gram negativo intracelular - *Neisseriae gonorrhoeae*

Tabela 9 - RESULTADO DE 289 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA MISTA (F2)

Lactobacilos	16	5,54%
Lactobacilos –estafilococos	53	18,34%
Lactobacilos –estreptococos	37	12,80%
Lactobacilos - <i>U. urealyticum</i>	142	49,13%
Lactobacilos - <i>M. hominis</i>	3	1,04%
Lactobacilos -micoplasmas e cocos	9	3,11%
Lactobacilos- <i>E. coli</i>	9	3,11%
Lactobacilos- <i>E. coli</i> - micoplasmas	8	2,77%
Outros	11	3,81%
Negativa	1	0,35%
TOTAL	289	100,0%

Gráfico 8 - RESULTADO DE 289 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA MISTA (F2)



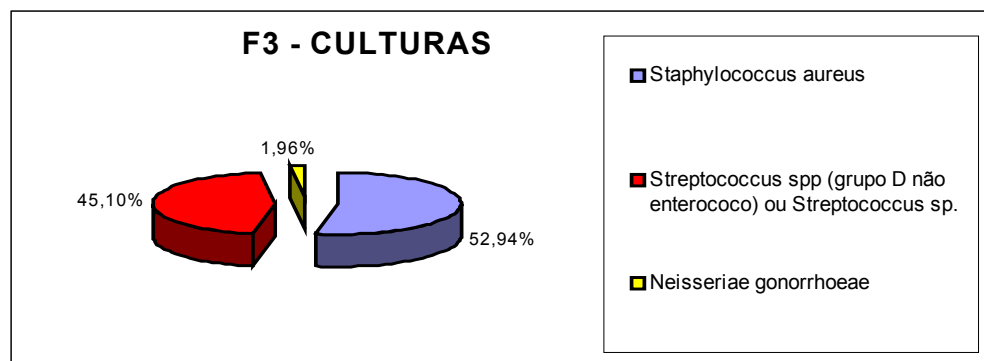
Os cocos (F3) foram encontrados em um total de 69 casos (0,6%), dentre os quais 59 (85,5%) foram diagnosticados com a associação do exame citológico e microbiológico distribuídos em 51 culturas e 8 bacterioscopias. O resultado das culturas (tabela 10, gráfico 9) mostrou o *S aureus* em 27 casos (52,9%), *Streptococcus spp* ou o *Streptococcus sp.* em 23 (45,0%) e 1 *Neisseriae gonorrhoeae* (2,0%).

Em 4 casos (5,7%) a imunofluorescência foi positiva para clamídia.

Tabela 10 - RESULTADO DE 51 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA DE COCOS (F3)

<i>Staphylococcus aureus</i>	27	52,94 %
<i>Streptococcus spp</i> (grupo D não enterococo) ou <i>Streptococcus sp.</i>	23	45,10 %
<i>Neisseriae gonorrhoeae</i>	1	1,96, %
TOTAL	51	100,0%

Gráfico 9 - RESULTADO DE 51 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA DE COCOS (F3)



Foi verificada com maior frequência a forma “cocóide” (F3) das bactérias, em um total de 380 casos (3,7%), em que 222 pacientes (58,4%) tinham idade acima dos 50 anos. A cultura foi solicitada em apenas 47 pacientes (12,3%) e o resultado (tabela 11, gráfico 8) mostrou 38 casos (80,9%) em que havia exacerbação dos micoplasmas genitais: 35 *U. urealyticum* e 8 *M. hominis*; em 6 casos, os micoplasmas estavam associados a cocos e 1 a *Mobiluncus* (tabela 11, gráfico 10).

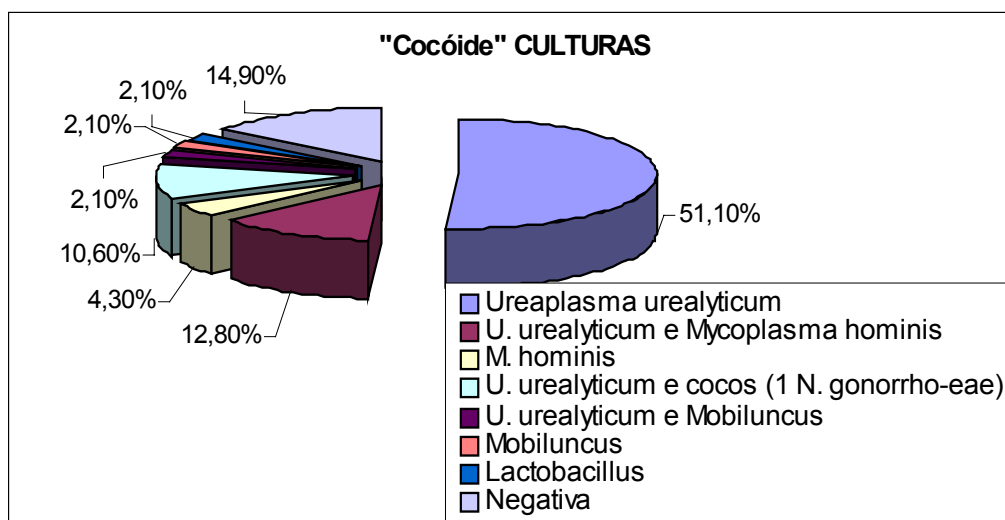
A correlação da citologia com a cultura mostrou até 2 bactérias/ esfregaço.

Em 4 casos (1,0%) a imunofluorescência foi positiva para clamídia.

Tabela 11 - RESULTADO DE 47 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA "COCÓIDE" (F3)

<i>Ureaplasma urealyticum</i>	24	51,10%
<i>U. urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>	6	12,80 %
<i>M. hominis</i>	2	4,30 %
<i>U. urealyticum</i> e cocos (1 <i>N. gonorrhoeae</i>)	5	10,60 %
<i>U. urealyticum</i> e <i>Mobiluncus</i>	1	2,10 %
<i>Mobiluncus</i>	1	2,10 %
<i>Lactobacillus</i>	1	2,10 %
Negativa	7	14,90 %
TOTAL	47	100,0%

Gráfico 10 - RESULTADO DE 47 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA "COCÓIDE" (F3)



A infecção bacteriana mais frequente foi a vaginose bacteriana (F4) com um total de 1.197 casos (11,8%) e em 832 (69,5%) o aspecto citológico era característico mostrando intensa proliferação bacteriana com presença de *clue cells*, ausência de *Lactobacillus* e leucócitos ausentes ou escassos. Em 308 casos (25,7%) a flora era sugestiva de *Gardnerella vaginalis*, mas acompanhada de numerosos neutrófilos e piócitos. Em 47 casos (3,9%) a BV estava associada à infecção por *Candida* sp, 9 (0,7%) associada a *Trichomonas vaginalis* e 1 HPV.

Foram realizados um total de 354 (29,5%) exames microbiológicos distribuídos em 333 culturas, 2 bacterioscopias e 19 (1,5%) imunofluorescências positivas para clamídia.

A correlação da citologia com a cultura mostrou até 3 microorganismos / esfregaço e 4 em 1 caso.

Nas pacientes com citologia característica de BV, o resultado de 279 culturas (tabela 12, gráfico 11) identificou apenas a *G. vaginalis* em 200 casos (71,7%); em 36 (13,0%) a *Gardnerella vaginalis* estava associada à exacerbação dos micoplasmas

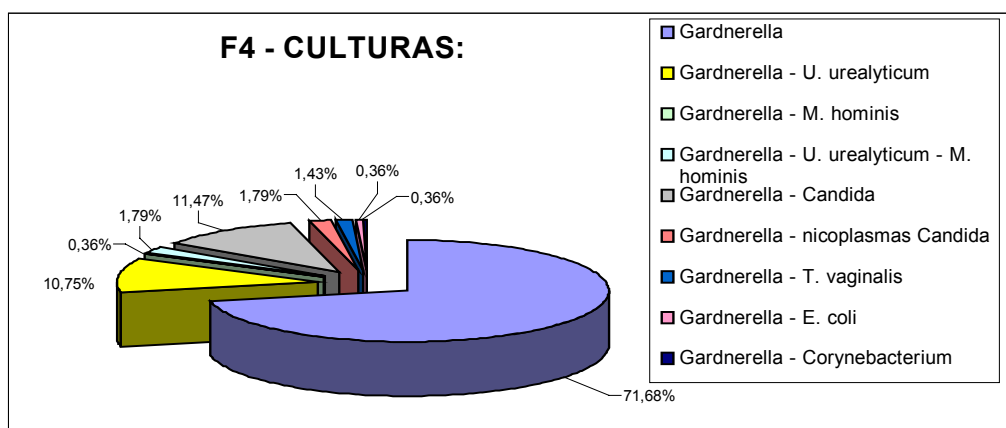
genitais: 35 *Ureaplasma urealyticum* e 6 *Mycoplasma hominis*; a infecção concomitante por *Candida sp.* foi confirmada em 32 casos (11,4%) e 5 (1,7%) em que a BV estava associada à *Candida sp.* e aos micoplasmas genitais; em 4 casos (1,4%) foi confirmada a infecção concomitante por *Trichomonas vaginalis*; outros microorganismos identificados foram a 1 *Escherichia coli* e 1 *Corynebacterium*.

Em 18 pacientes a imunofluorescência foi positiva para clamídia.

Tabela 12 - RESULTADO DE 279 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA DE *Gardnerella vaginalis* (F4)

<i>Gardnerella</i>	200	71,68 %
<i>Gardnerella – U. urealyticum</i>	30	10,75 %
<i>Gardnerella – M. hominis</i>	1	0,36 %
<i>Gardnerella – U. urealyticum - M. hominis</i>	5	1,79 %
<i>Gardnerella – cândida</i>	32	11,47 %
<i>Gardnerella – micoplasmas – cândida</i>	5	1,79 %
<i>Gardnerella - T. vaginalis</i>	4	1,43 %
<i>Gardnerella - E. coli</i>	1	0,36 %
<i>Gardnerella – Corynebacterium</i>	1	0,36 %
TOTAL	279	100,0%

Gráfico 11 - RESULTADO DE 279 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA DE *Gardnerella vaginalis* (F4)



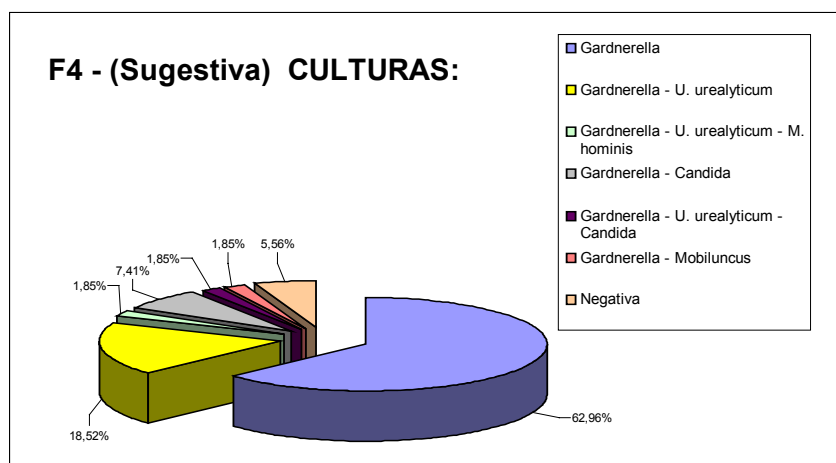
Nas pacientes em que a citologia sugeria BV mas era acompanhada de exsudato, o resultado de 54 culturas (tabela 13, gráfico 12) identificou somente a *G. vaginalis* em 34 casos (62,9%); em 12 (22,3%) a *G. vaginalis* estava associada ao *U. urealyticum* e apenas 1 *M. hominis*; em 5 casos (9,3%) foi confirmada infecção concomitante por *Candida sp*; foi identificado 1 *Mobiluncus* e 3 culturas foram negativas (indicando necessidade de repetição).

Em 1 paciente o resultado da bacterioscopia mostrou cocos Gram negativos.

Tabela 13 - RESULTADO DE 54 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA SUGESTIVA DE *G.vaginalis* (sug. F4)

<i>Gardnerella</i>	34	62,96%
<i>Gardnerella - U. urealyticum</i>	10	18,52%
<i>G.vaginalis- U.urealyticum - M. hominis</i>	1	1,85%
<i>Gardnerella – cândida</i>	4	7,41%
<i>Gardnerella - U. urealyticum – cândida</i>	1	1,85%
<i>Gardnerella – Mobiluncus</i>	1	1,85%
Negativa	3	5,56%
TOTAL	54	100,0%

Gráfico 12 - RESULTADO DE 54 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS CODIFICADOS COMO FLORA SUGESTIVA DE *G. vaginalis* (sug.F4)



A bactéria denominada *Leptotrix* (F5) que pertence à mesma família dos *Lactobacillus*, esteve presente em 468 casos (3,4%), isoladamente ou associada a *Lactobacillus*. Ainda estavam presentes nesta amostra, associados a microorganismos patogênicos, totalizando 609 casos (6,0%)

A infecção por *Trichomonas vaginalis* (F6) foi diagnosticada em 133 casos (1,3%), 63 (47,3%) com microscopia característica ao exame citológico, representada pela presença de leucócitos em maior ou menor quantidade, alterações das propriedades tintoriais das células epiteliais devido à inflamação, alteração da flora bacteriana vaginal e presença das tricomonas. Em 40 casos (30,0%) os *Lactobacillus* ainda faziam parte da flora vaginal, em 7 (5,2%) estavam presentes *Leptotrix vaginalis*; em 9 casos (6,7%) havia tricomonas e BV ; em 12 casos (9,0%) havia infecção concomitante por *T. vaginalis* e *Candida sp.* No esfregaço citológico de 55 pacientes (41,3%) havia inflamação purulenta e 40 eram insatisfatórios. A infecção por tricomonas foi diagnosticada somente com o exame citológico em 75,9% dos casos.

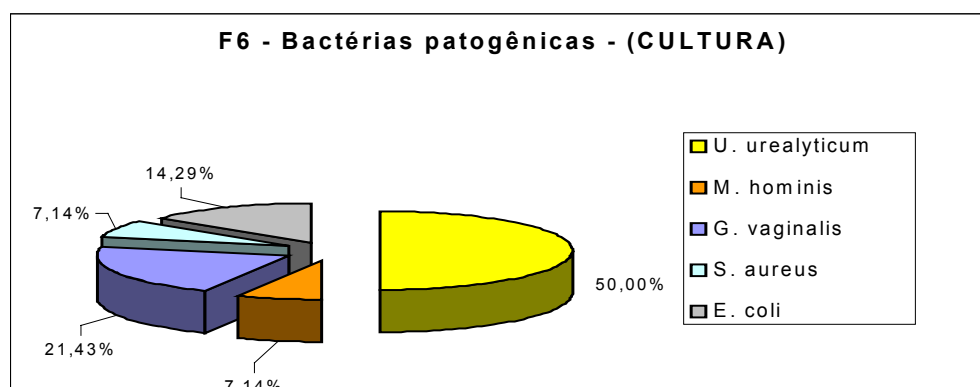
Foram realizados 32 exames microbiológicos: cultura, em 15 casos, e / ou o exame direto T+M (tabela 14, gráfico 13). A flora bacteriana associada à *T. vaginalis* foi pouco investigada com a cultura que mostrou a exacerbação dos micoplasmas genitais em 8 casos: 7 *U. urealyticum* e 1 *M. hominis* (57,1%), em 4 casos (já referidos) *Gardnerella vaginalis*, 2 *E. coli* (14,2%) e 1 *Staphylococcus aureus* (7,1%). Nos demais casos, o T+M confirmou a infecção por tricomonas, em 4 casos (3,0%) associada à *Candida sp.*

A correlação da citologia com a cultura ou T+M mostrou até 3 microorganismos / esfregaço.

**Tabela 14 - BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ASSOCIADAS A TRICOMONAS (F6).
RESULTADO DE 21 CULTURAS (até 3 microorganismos / esfregaço)**

<i>U. urealyticum</i>	7	50,00%
<i>M. hominis</i>	1	7,14%
<i>G. vaginalis</i>	4	21,43%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	7,14%
<i>Escherichia coli</i>	2	14,29%
TOTAL	15	100,0%

**Gráfico 13 - BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ASSOCIADAS A TRICOMONAS (F6)
RESULTADO DE 21 CULTURAS (até 3 microorganismos / esfregaço)**



A infecção por *Chlamydia trachomatis* totalizou 94 casos (0,9%), dos quais 85 (90,4%) foram diagnosticados com imunofluorescência e somente em 9 casos (9,5%), o exame citológico sugeria clamídia; 63 pacientes (67,0%) tinham menos de 30 anos de idade; as células metaplásicas estavam presentes em 36 casos (38,2%) e as células endocervicais em 4 (4,2%). Nas pacientes com clamídia, o total de 80 culturas e 1 bacterioscopia realizadas mostrou *Lactobacillus* em 30 casos (37,5%), 44 (55,0%) de infecção por *C. trachomatis* associada a infecção bacteriana ou exacerbação de micoplasmas genitais, e 11 (13,7%) associada à *Candida sp.*

A frequência de C V V (F8) foi de 17,7% (1.785 casos) e superou a BV. O exame citológico diagnostica a *Candida sp.* do mesmo modo que o exame direto, identificando esporos, pseudo-hifas e hifas no esfregaço. Ao exame citológico, a proliferação da *Candida sp.* com lactobacilos exacerbados aderidos às células epiteliais, vista em 1.519 casos (85,0%) correspondia - ou à **colonização**, ou à **infecção primária**, esta com leucócitos indicando reação inflamatória. As hifas estavam presentes em 817 esfregaços (45,7%) indicando **doença invasiva**. A **associação** da *Candida sp.* com outros microorganismos, ou uma **infecção secundária por cândida**, foi ainda encontrada em 47 casos de BV e 12 casos de *T. vaginalis*, já referidos.

Em 1.334 (74,7%) casos, a vulvo-vaginite por *Candida sp* ou C V V, foi diagnosticada somente com o exame citológico e, em 451 (25,2%), o exame microbiológico (cultura, T+M) foi também solicitado pelo clínico. Os *Lactobacillus sp.* faziam parte da flora identificada com a cultura em 331 (80,3%) casos e *Leptotrix vaginalis* em 23 (5,58%). A cultura, realizada em 412 pacientes, identificou 127 (28,1%) em que a *Candida sp.* estava associada a bactérias (69 casos), ou *Mollicutes* (48 casos), e ainda, a associação de bactérias, micoplasmas e cândida (10 casos). A distribuição desses microorganismos patogênicos pode ser vista na tabela 15, gráfico 14, onde houve predomínio do *Ureaplasma urealyticum* (41,6%), seguida da *Gardnerella vaginalis* (30,6%)

A correlação da citologia com a cultura ou T+M mostrou até 4 microorganismos/esfregaço.

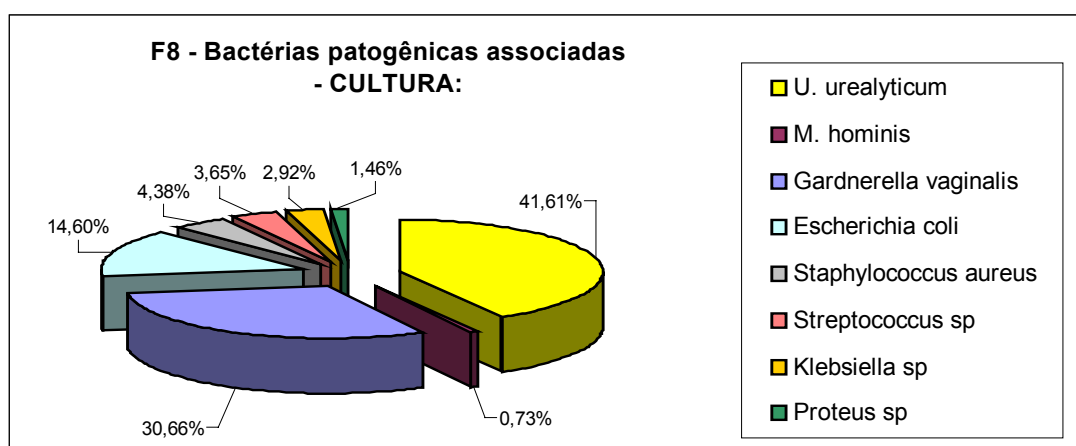
A imunofluorescência foi positiva para clamídia em 12 casos (0,6%).

A incidência da *Candida sp* em gestantes foi de 32,9% : 86 de um total de 261 gestantes.

**Tabela 15-BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ASSOCIADAS A CANDIDA (F8).
RESULTADO DE 123 CULTURAS - de um total de 412 (até 4
microorganismos / esfregaço)**

<i>U. urealyticum</i>	57	41,61%
<i>M. hominis</i>	1	0,73%
<i>Gardnerella vaginalis</i>	42	30,66%
<i>Escherichia coli</i>	20	14,60%
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	4,38%
<i>Streptococcus sp</i>	5	3,65%
<i>Klebsiella sp</i>	4	2,92%
<i>Proteus sp</i>	2	1,46%
TOTAL	137	100,0%

**Gráfico 14 - BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ASSOCIADAS A CANDIDA (F8).
RESULTADO DE 123 CULTURAS - de um total de 412 (até 4microorganismos
/ esfregaço)**



Em 377 casos (3,7%) não foi possível identificar a flora (F11) com a coloração de Papanicolaou e 52 destes esfregaços (13,7%) foram classificados como insatisfatórios devido à inflamação intensa, hemorragia ou ambas, o que dificultou a colheita em algumas pacientes. A flora não classificada também foi encontrada em 68 pacientes na menopausa (18,0%), e o esfregaço apresentava ou uma flora escassa ou inflamação intensa. Foram realizadas 154 culturas (tabela 16, gráfico 15), 60 com

resultado negativo (38,9%) e 94 (61,0%) positivas, demonstrando bactérias que não são identificáveis com a coloração de Papanicolaou.

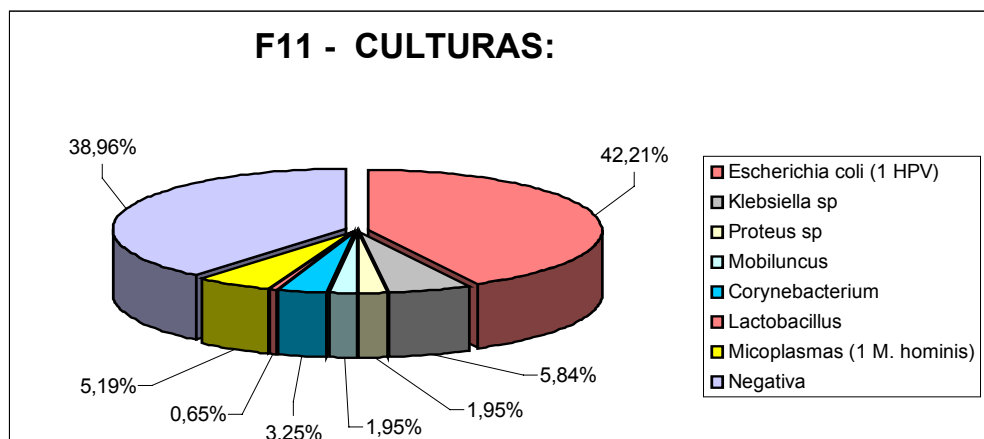
A correlação da citologia com a cultura mostrou até 3 bactérias / esfregaço.

Em 3 casos (0,7%) a imunofluorescência foi positiva para clamídia.

Tabela 16 – RESULTADOS DE 154 CULTURAS DA FLORA NÃO CLASSIFICADA COM O EXAME CITOLÓGICO (F11)

<i>Escherichia coli</i>	65	42,21%
<i>Klebsiella sp</i>	9	5,84%
<i>Proteus sp</i>	3	1,95%
<i>Mobiluncus</i>	3	1,95%
<i>Corynebacterium</i>	5	3,25%
<i>Lactobacillus</i>	1	0,65%
Micoplasmas (1 <i>M. hominis</i>)	8	5,19%
Negativa	60	38,96%
TOTAL	154	100,0%

Gráfico 15 – RESULTADO DE 154 CULTURAS DA FLORA NÃO CLASSIFICADA COM O EXAME CITOLÓGICO (F11)



O processo inflamatório foi identificado, ao exame citopatológico, em 8.665 casos (86 %) desta amostra. A classificação das inflamações de acordo com a intensidade: leve, moderada e intensa resultou na distribuição vista na tabela 17, onde se nota predomínio de inflamação moderada (77,0%):

Tabela 17 - DISTRIBUIÇÃO DAS INFLAMAÇÕES DE ACORDO COM A INTENSIDADE

	Nº	total de 8.655	total de 10.064
Inflamação leve	1242	14,35%	12,34%
Inflamação moderada	6664	77,00%	66,22%
Inflamação intensa	749	8,65%	7,44%
Outros	1409	-	14,00%
TOTAL	10.064	100,00%	100,00%

A análise de 171 culturas de 749 pacientes que apresentavam **cervicite muco-purulenta (CMP)** ou **inflamação intensa**, e esfregaço insatisfatório, mostrou 32 casos em que não havia bactérias patogênicas e foram identificados somente *Lactobacillus*, e 28 em que o resultado da cultura foi negativo (tabela 18, gráfico 16). Esses 60 casos (35,0%) sugerem alteração da flora endógena, ou fatores não relacionados com infecção associados ou não à cervicite, a menos que a repetição dessas culturas negativas detectasse algum microorganismo patogênico. No entanto, apenas 69 (0,60%) pacientes desta amostra, realizaram outro exame citológico no mesmo laboratório, com intervalo de 6 meses, num total de 64 retornos.

A **infecção bacteriana** foi diagnosticada em 35 casos (20,4%), a **exacerbação dos micoplasmas genitais** em 21 (12,2%) e em 9 casos (5,26%) havia **associação** de infecção bacteriana com micoplasmas genitais. A **inflamação intensa** também ocorreu: a) em 31 casos (18,1%) em que havia *Candida sp.*, 11 associados com infecção bacteriana ou exacerbação de micoplasmas genitais; b) em 11 casos (6,4%) em que havia *T. vaginalis*, 9 associados a infecção bacteriana ou exacerbação de micoplasmas genitais; c) em 4 casos (2,3%) em que havia infecção por *T. vaginalis* e *Candida sp.* (tabela 18, gráfico 16)

A imunofluorescência para clamídia foi positiva em 10 casos (1,3%).

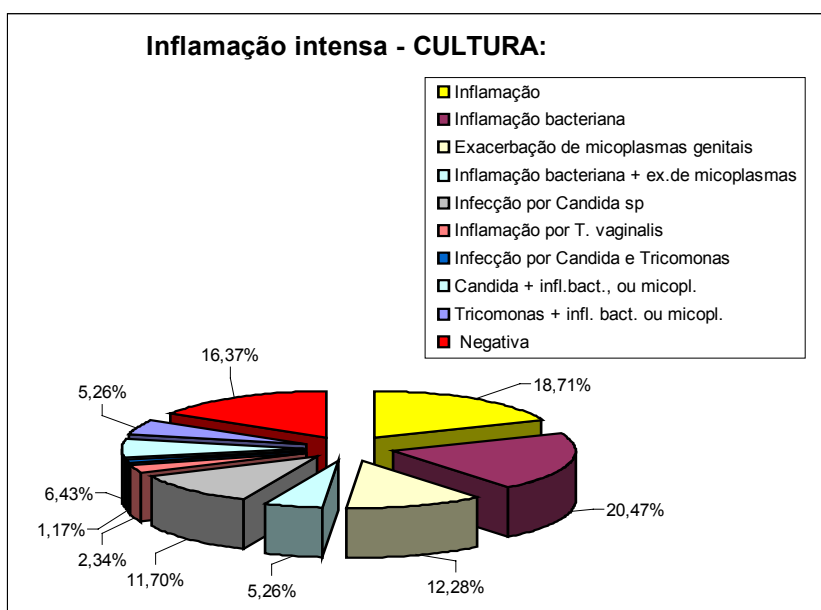
Observa-se que a frequência dos casos de inflamação (32 casos) somada às inflamações bacterianas (35 casos): 39,1% é superior à exacerbação dos micoplasmas

genitais (21 casos): 12,2 %, que, nesta amostra, não apareceram como a principal causa de inflamação intensa.

Tabela 18 – RESULTADO DE 171 CULTURAS DAS INFLAMAÇÕES INTENSAS:

Inflamação	32	18,71%
Inflamação bacteriana	35	20,47%
Exacerbação de micoplasmas genitais	21	12,28%
Inflamação bacteriana + exacerbação.de micoplasmas genitais	9	5,26%
Infecção por <i>Candida sp.</i>	20	11,70%
Infecção por <i>T. vaginalis</i>	4	2,34%
Infecção por cândida e tricomonas	2	1,17%
Cândida + infl.bact. ou ex. micoplasmas	11	6,43%
Tricomonas+infl.bact.ou ex.micoplasmas	9	5,26%
Negativa	28	16,37%
TOTAL	171	100,0%

Gráfico 16 – RESULTADO DE 171 CULTURAS DOS ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS COM INFLAMAÇÃO INTENSA:



4.4 – FOTOMICROGRAFIAS DE ALGUNS CASOS ESTUDADOS:

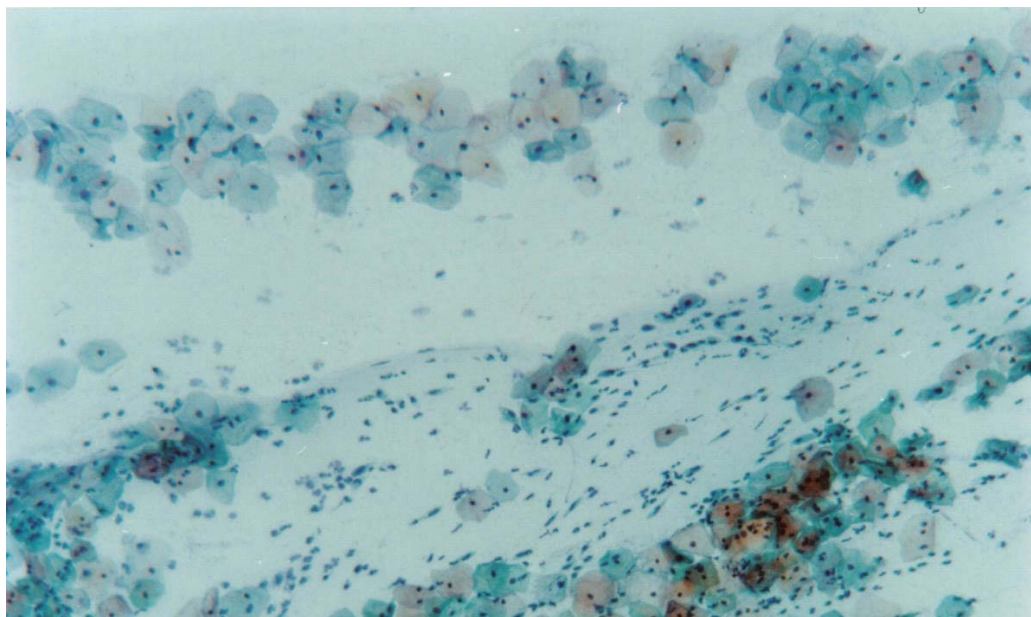


Figura 1- Inflamação leve. Notar o exsudato em meio a muco e às células epiteliais; flora de *Lactobacillus* sp.
Original: Papanicolaou 100X

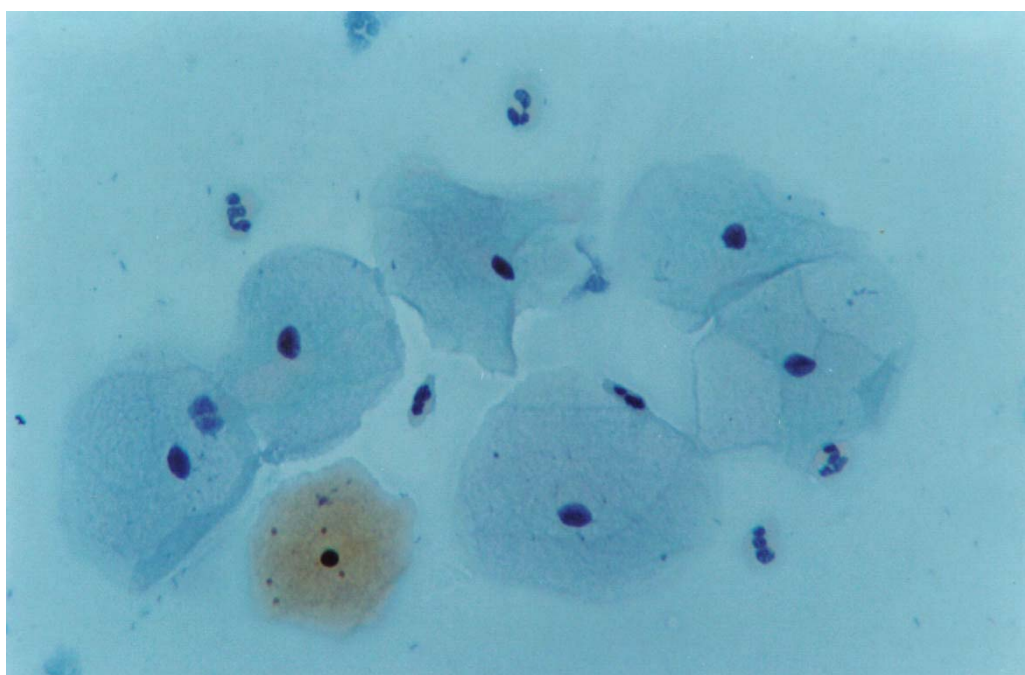


Figura 2 - Inflamação leve. Notar agrupamento de células intermediárias e superficiais com halo peri-nuclear, entremeadas por alguns neutrófilos.
Original: Papanicolaou 1000X.

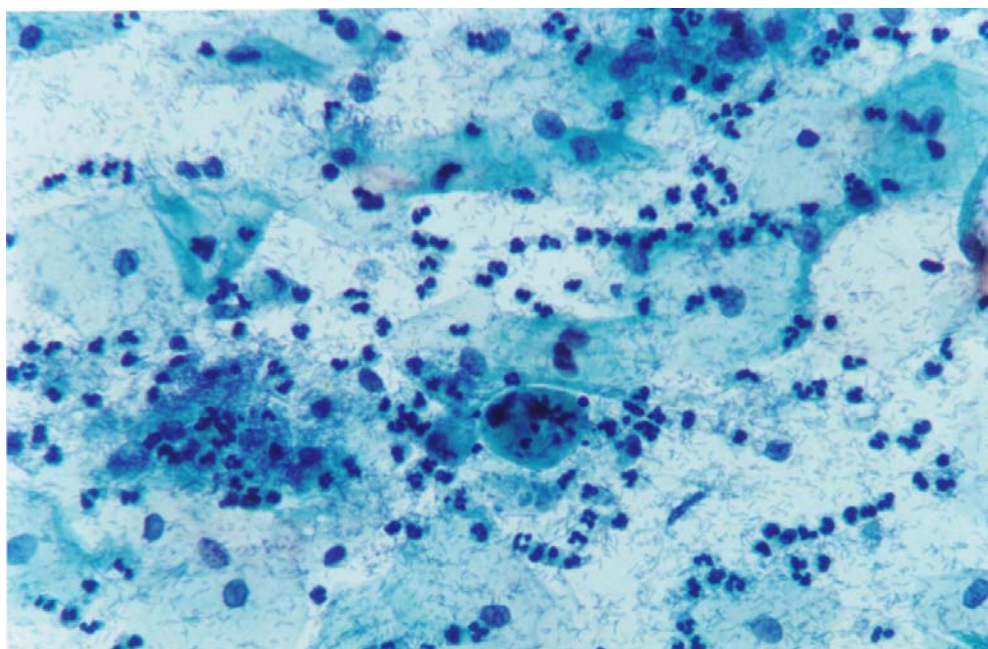


Figura 3 - Inflamação moderada. Notar o exsudato inflamatório em meio às células epiteliais e célula sincicial; *Lactobacillus sp.* exacerbados.
Original: Papanicolaou 400X

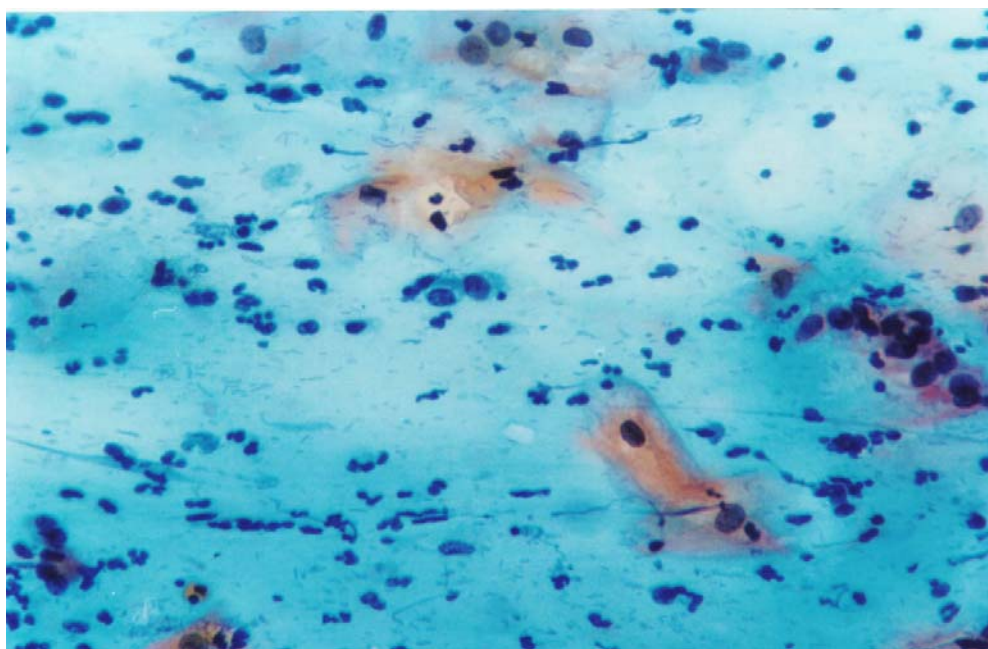


Figura 4 - Inflamação moderada. Notar o fundo seroso do esfregaço, leucócitos, células epiteliais picnóticas, atipias inflamatórias e flora escassa.
Original: Papanicolaou 400X

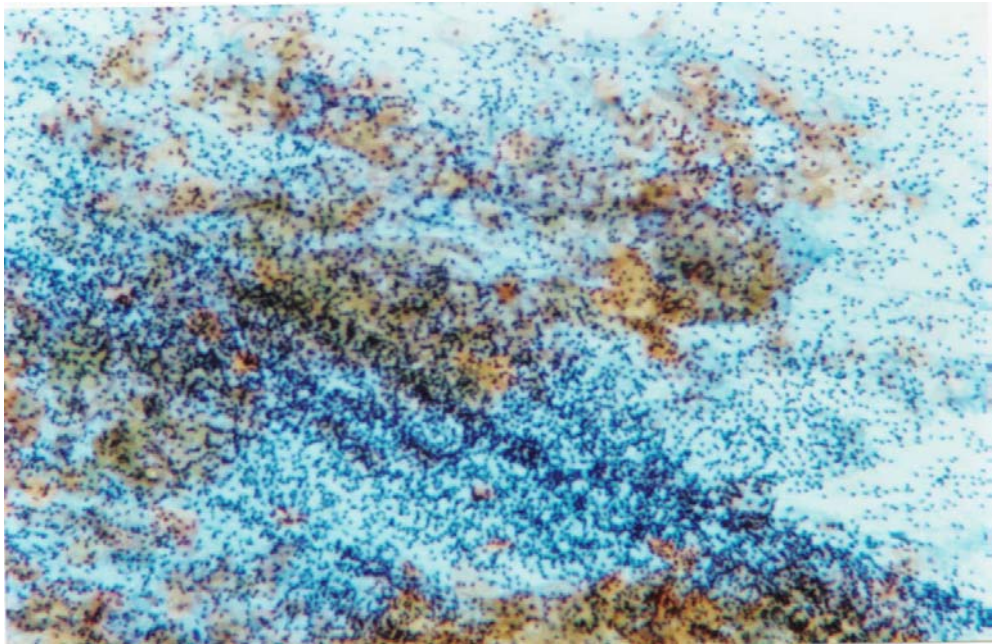


Figura 5 - Inflamação intensa. Notar o exsudato inflamatório cobrindo mais de 50% do esfregaço insatisfatório. Cervicite muco-purulenta (CMP)
Original: Papanicolaou 100XV

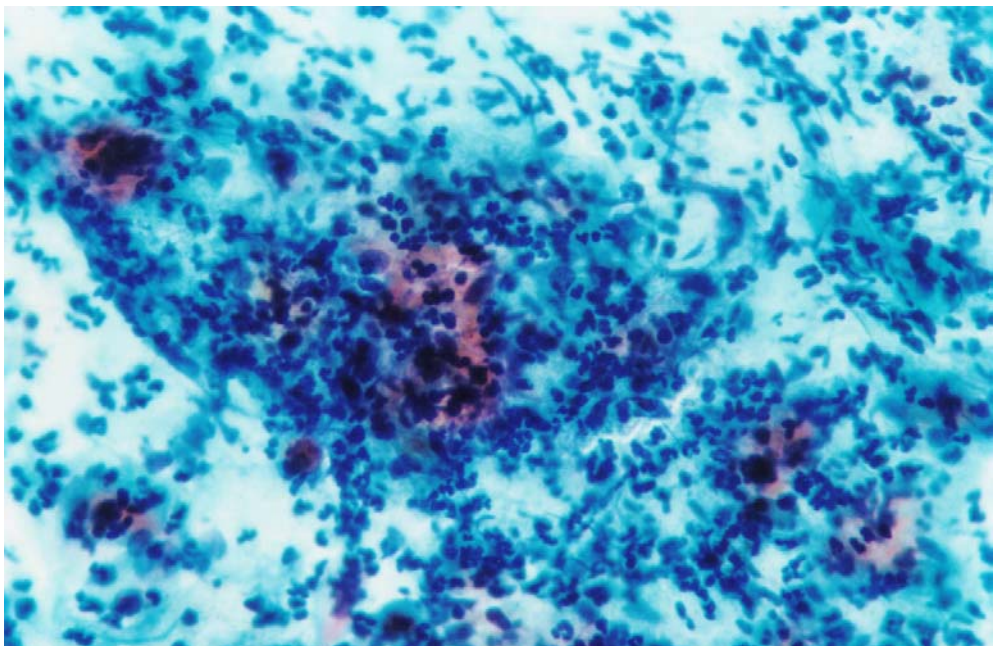


Figura 6 - Inflamação intensa. Notar as células epiteliais e a flora obscurecidas pelo exsudato purulento.
Original: Papanicolaou 400X

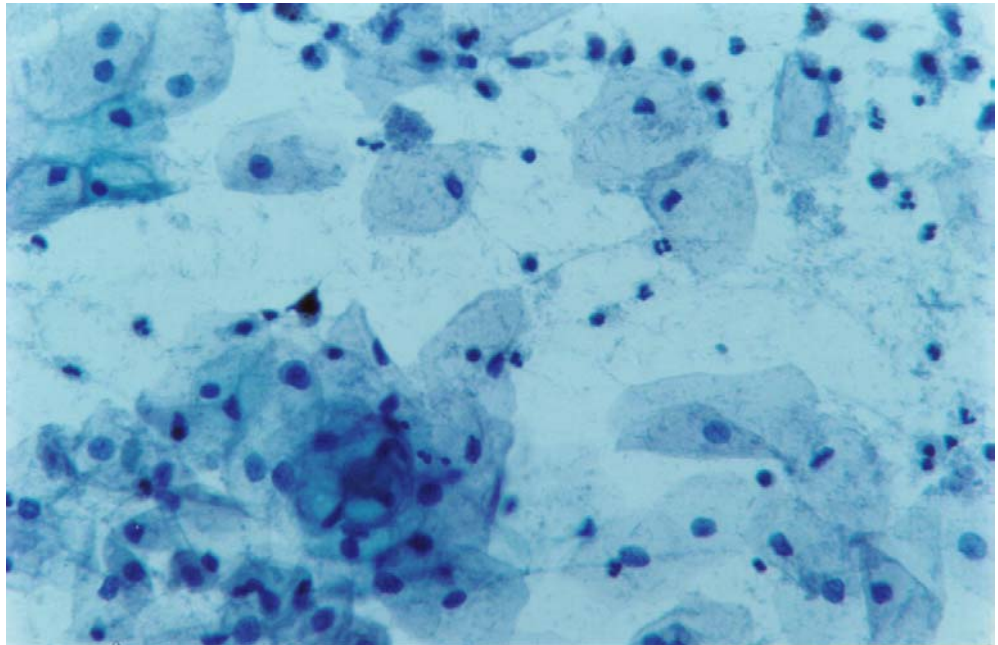


Figura 7 - Notar as células epiteliais entremeadas por alguns leucócitos; flora tipo mista. A cultura identificou *Lactobacillus sp* e *Ureaplasma urealyticum*.
Original: Papanicolaou 400X

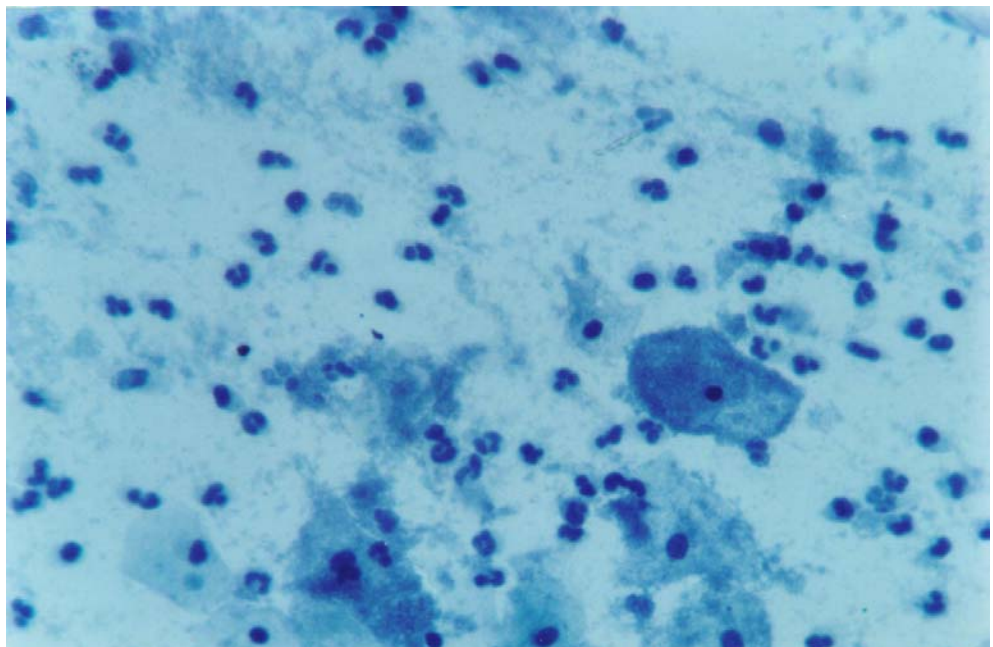


Figura 8 - Infecção por *Gardnerella vaginalis* (B V). Notar a presença de "célula-guia" e o exsudato predominantemente neutrofílico. A cultura não foi solicitada pelo clínico.
Original Papanicolaou 400X

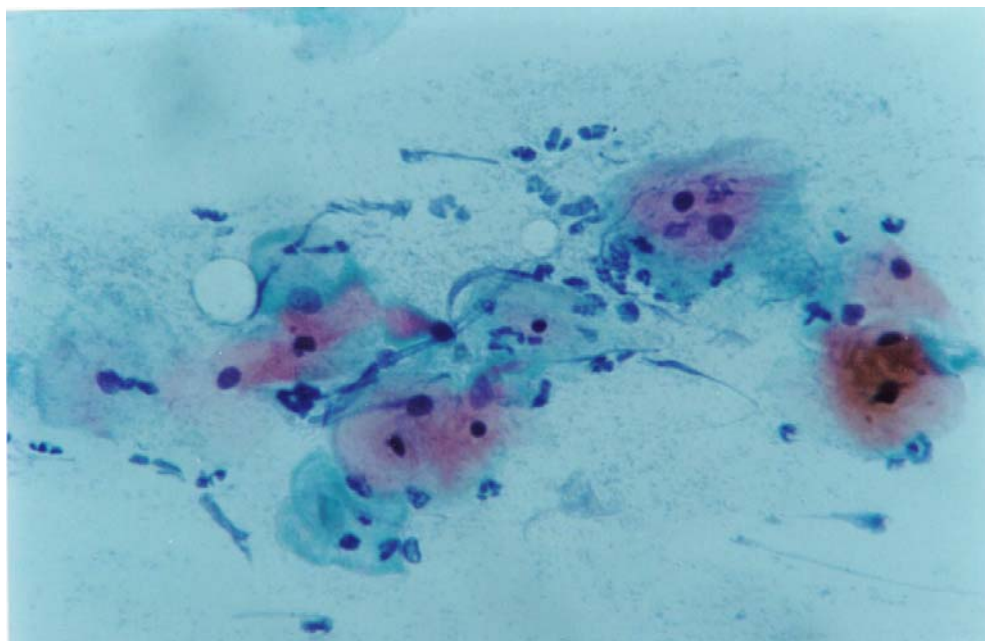


Figura 9 - Notar as células superficiais e intermediárias entremeadas por leucócitos e filamentos de muco; flora tipo mista. A cultura identificou *Lactobacillus* sp e *S. agalactiae*.
Original: Papanicolaou 400X

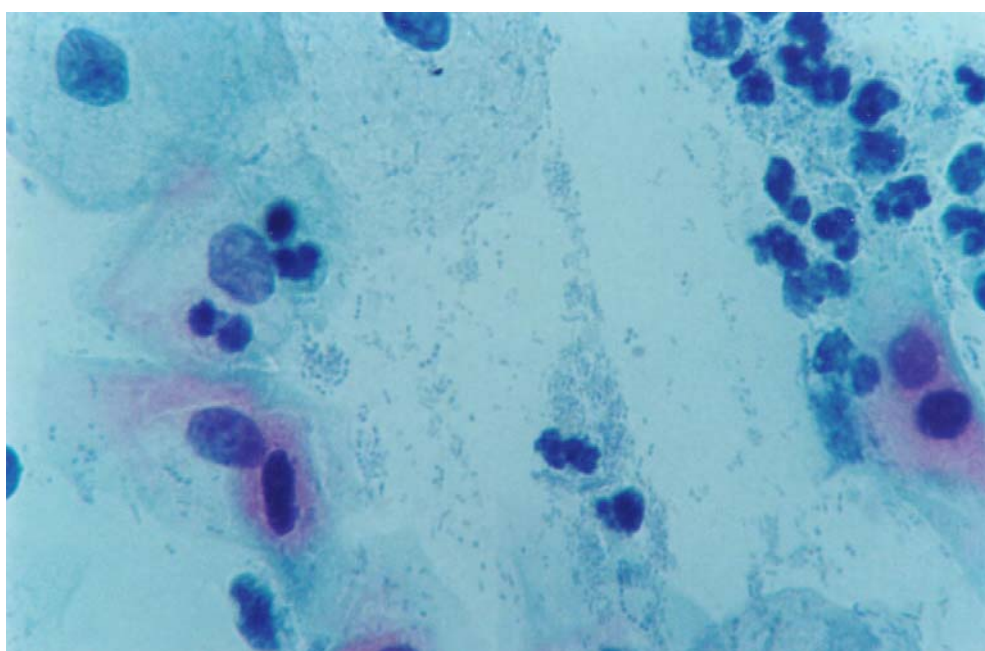


Figura 10 - Notar as células epiteliais e leucócitos em meio a intensa proliferação bacteriana. Células núcleo hiper cromático. A cultura identificou *Streptococcus* spp.
Original: Papanicolaou 1000X

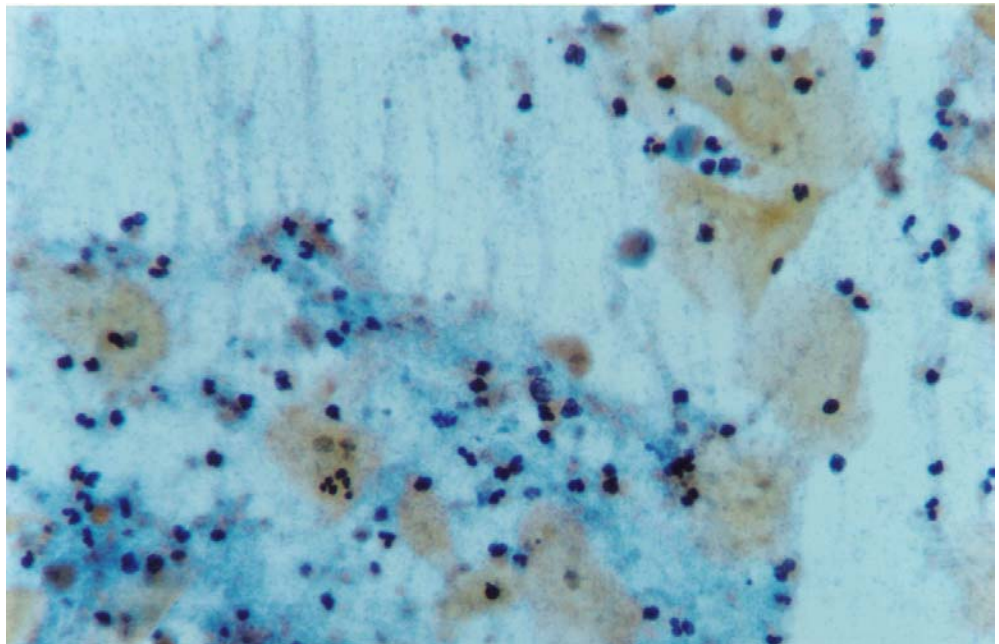


Figura 11 - Infecção por *Trichomonas vaginalis*. Notar o protozoário em meio às células epiteliais, leucócitos e proliferação bacteriana, dando aspecto de “esfregaço sujo”. Não foi realizada a cultura para investigar se há infecção bacteriana associada às tricomonas.
Original: Papanicolaou 400X

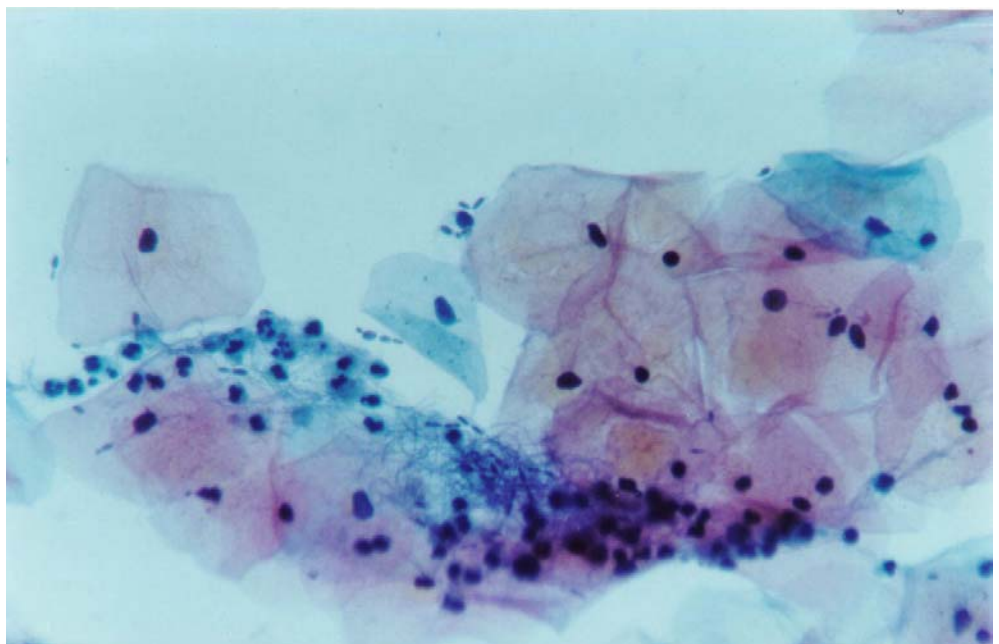


Figura 12 - Infecção por *Candida sp.* (CV V). Notar as pseudo-hifas e algumas hifas em meio às células epiteliais e leucócitos agrupados, *Lactobacillus sp.* e *Leptotrix vaginalis*.
Original: Papanicolaou 1000X

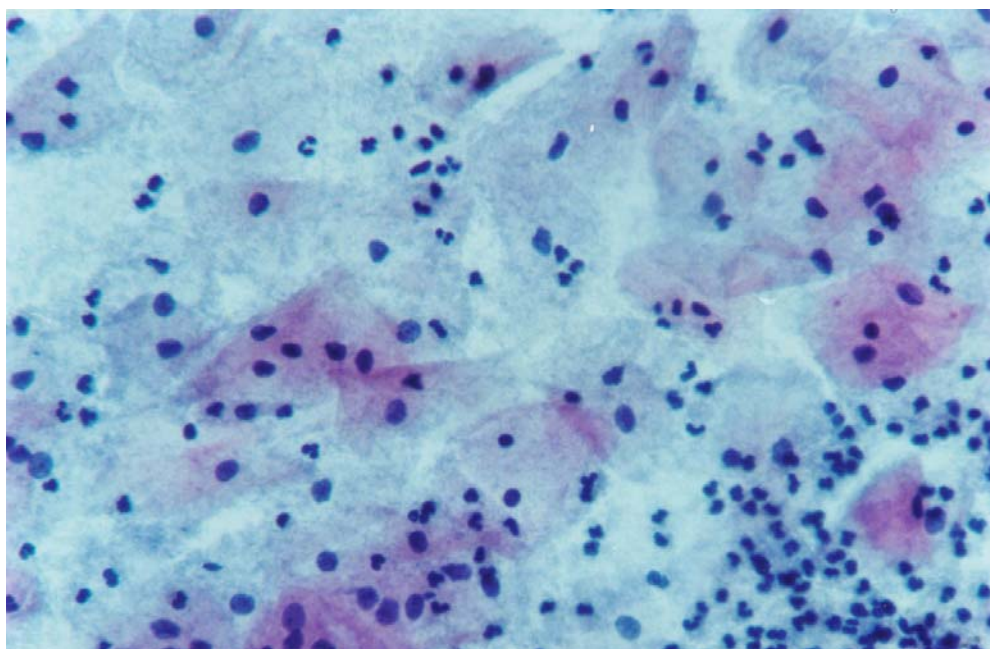


Figura 13 - Notar as células epiteliais entremeadas por neutrófilos e outros leucócitos; flora representada pela proliferação de bacilos não identificados. A cultura não foi realizada.
Original: Papanicolaou 400X

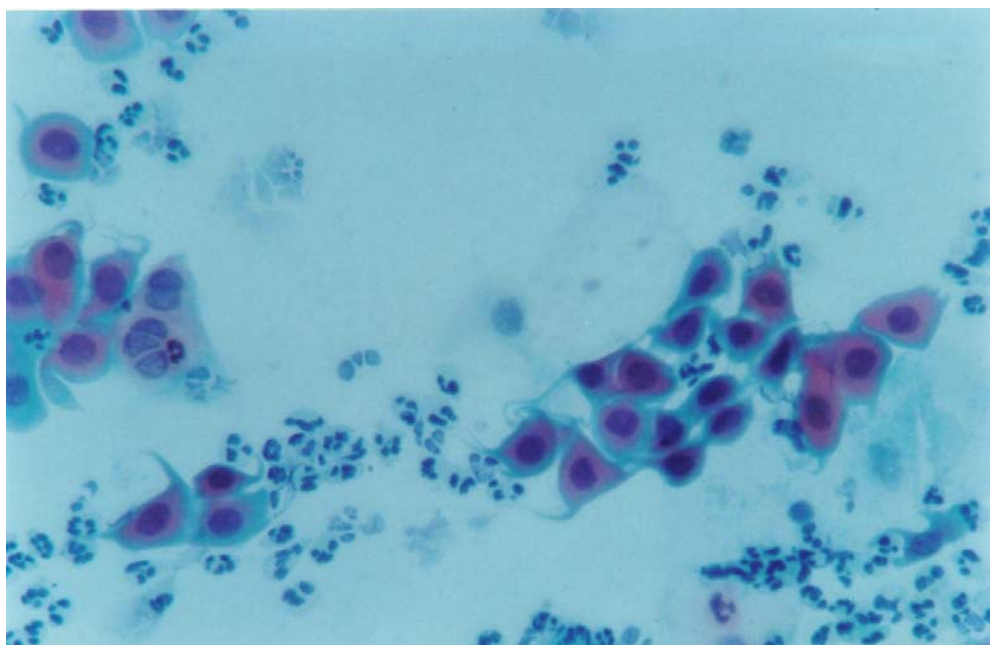


Figura 14 – Cervicite crônica . Notar as células metaplásicas agrupadas e neutrófilos; flora escassa e fundo claro, sem muco aparente.
Original: Papanicolaou 1000X.

5.0 - DISCUSSÃO

5.0 - DISCUSSÃO

A análise dos resultados mostra que as pacientes que habitualmente comparecem à consulta ginecológica estão em fase de vida sexual ativa ou em idade reprodutiva, representadas nesta amostra, por 8.013 pacientes (79,6 %) com 20 a 49 anos, dentre estas, 6.235 (61,9 %) na faixa de 20 a 39 anos; 5.840 pacientes (58,0 %) tinham de 1 a 5 filhos, 420 (7,1%) tiveram de 6 a 11 filhos e 314 (4,1%) estavam gestantes ou no pós-parto. Esses dados que demonstram a fertilidade que é verificada em estudos da população brasileira.

No entanto, também chama a atenção o grande número de mulheres sem filhos, que totalizaram 3.426 pacientes (34,0 %), dentre estas 735 não informaram o número de filhos e 2.694 eram nulíparas, que representaram 26,7 %, percentagem significativa no total de pacientes avaliadas neste estudo.

Nas mulheres que tiveram maior número de filhos, foi menor o número de abortos, mas o número de pacientes com 1 a 2 abortos: 2.271 casos, ou 1 a 5 abortos: 2.516 casos, é alto, quando comparado com o total de 5.840 pacientes que tiveram de 1 a 5 filhos: dentre as pacientes com 1 a 5 filhos 38,8 % tiveram 1 a 3 abortos e 43,0 % 1 a 5 abortos.

Somente 861 (8,5 %) pacientes informaram o uso de anti-concepcional, 662 (76,8 %) AHO; 660 (2,5 %) haviam sido submetidas à histerectomia total ou parcial e 864 (8,5 %) estavam na menopausa.

5.1 - A avaliação das amostras e a prevalência de inflamação nos exames e citologia cérvico-vaginal:

De acordo com as normas do Sistema Bethesda, 1991, 3.437 (34,1%) esfregaços foram qualificados como “satisfatórios” e, somados aos qualificados como “satisfatórios porém limitados”, totalizaram 9.565 (95,0 %); somente 499 esfregaços (4,9 %) eram “insatisfatórios”, o que atende às exigências do Sistema Bethesda no que se refere ao

padrão dos esfregaços. Em 2001, o Sistema Bethesda eliminou "satisfatório porém limitado". Todos os esfregaços "satisfatórios" desta amostra apresentavam células colunares e / ou metaplásicas, de origem endocervical e os exames foram enviados com os dados clínicos completos. Os "satisfatórios porém limitados" não apresentavam células endocervicais ou metaplásicas. Os "insatisfatórios" eram principalmente esfregaços com o material representado por inflamação que prejudicava a avaliação oncótica, ou esfregaços hemorrágicos. (117)

Nesta amostra, a baixa prevalência de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) – 11 casos (0,099 %) também mostra que é interessante valorizar a pesquisa de agentes inflamatórios. A baixa prevalência de neoplasia pode ainda ser relacionada com características próprias da população estudada, constituída de pacientes atendidas pela clínica privada e com maior facilidade de acesso à realização anual do exame citológico para a prevenção do câncer ginecológico; essas possibilidades não foram avaliadas neste estudo, mas necessitam ser confirmadas. Em 239 (2,3 %) casos foram observadas células atípicas, ou atípicas, (OMS), e o laudo foi acompanhado da recomendação da necessidade de acompanhamento clínico e controle com exame citológico, ou realização de biópsia do colo uterino. (2,33,40,86,110)

O exame citológico cérvico-vaginal, que é Oncótico por definição, detectou paralelamente, 8.655 (86,0 %) casos de inflamação e / ou infecção vaginal ou cérvico-vaginal e somente 1.089 (10,8 %) esfregaços normais. Estes dados correspondem ao que ocorre rotineiramente: pacientes sem lesões neoplásicas ou pré-neoplásicas, não apresentam somente o esfregaço normal, mas apresentam, inflamação e / ou infecção do trato genital inferior, em percentagem muito maior que os normais e facilmente vista ao exame citológico. No entanto, essa conclusão é compreendida na prática, como um diagnóstico secundário, mesmo na ausência de neoplasia, e em geral, faz parte do laudo no Brasil, mas em outros países, frequentemente é comunicada informalmente ou por telefone. Assim, enquanto neste estudo, a inflamação e / ou infecção esteve presente em

86,0 % dos casos, esse índice é pouco citado na literatura norte-americana, de 5 a 25%, referido por Eckert et al. (1995); Malik et al.(2001) encontraram alterações celulares benignas em 23% de 1.103 esfregaços citológicos, 8% com infecções que chamou de “específicas” e 92% com alterações reativas; 92 pacientes (8,3%) foram submetidas à biópsia, que apresentou alterações consideradas de “nenhum significado patológico”; Malik comenta que, de acordo com o College of American Pathologists, 9% dos laboratórios nos EUA tem taxa de alterações celulares benignas menor que 20%. Outros autores como Carrera et al.(1977) referem o esfregaço inflamatório coincide em 85% com a inflamação vista à colposcopia. (20,25,30,81,126).

A revisão bibliográfica mostrou que a inflamação no trato genital inferior feminino - não relacionada ao vírus HPV - e as infecções, encontradas com o exame citológico cérvico-vaginal, são pouco estudadas por meio da correlação com exames microbiológicos, o que depende ainda, de qual ou quais tipos de agentes patogênicos foram investigados. Após as conferências que originaram o Sistema Bethesda, publicações sobre as Alterações Celulares Benignas, ou BCC, são raras.

Este estudo foi realizado com amostra não selecionada, representada por 10.064 pacientes encaminhadas ao laboratório para exame de citologia vaginal e, em 21,5 % ou 2.169 casos, foi também realizada a cultura e / ou bacterioscopia da secreção vaginal. Esses exames foram solicitados a critério clínico durante a rotina do atendimento médico a essas pacientes. A cultura da secreção foi o exame microbiológico mais solicitado e representou 94,8 % do total de 2.254 exames microbiológicos realizados. A microflora vaginal visível com a coloração de Papanicolaou foi classificada de acordo com a codificação de F1 a F11 e correlacionada com o resultado das culturas, que confirmou ou especificou os microorganismos presentes no esfregaço citológico. O exame citológico foi realizado com atenção às principais características do processo inflamatório. A classificação antiga foi então re-avaliada, em comparação com as especificações para

microorganismos propostas pelo Sistema Bethesda para o laudo do exame citológico. (11,30,63,73,77,79,80,81,117,122,126)

5.2 - Principais observações sobre a prevalência dos agentes identificados com o exame citopatológico e microbiológico nesta amostra:

A prevalência dos microorganismos detectados com a coloração de Papanicolaou, mostrou predominância de *Lactobacillus* (4.550 casos - 45,2 %) seguida pelas infecções por *Candida sp* (1.519 casos –15,0 %) e *Gardnerella vaginalis* (1194 casos-11,8 %), confirmados com a cultura em 31,5 %, 12,2 % e 10,7 %, respectivamente, onde esses agentes também foram predominantes, conforme os resultados das Tabelas 7 e 8.

Lactobacillus foram encontrados nesta amostra, em esfregaços normais sem atrofia, em esfregaços citolíticos e em esfregaços inflamatórios. Quando acompanhados de **inflamação**, podem ser relacionados à alteração do ecossistema vaginal ou à citólise e podem ainda estar associados a bactérias patogênicas causadoras de **infecção** a ser pesquisada. Em esfregaços de pacientes na menopausa, *Lactobacillus* presentes ou remanescentes, podem ser relacionados a uma microflora ainda preservada, apesar da atrofia epitelial e o consequente declínio do glicogênio nas células epiteliais. A *Candida sp.* e *Gardnerella vaginalis*, microorganismos patogênicos mais prevalentes nesta amostra, são também mundialmente reconhecidos como os agentes mais frequentes de infecção do trato genital inferior feminino. (36,37,38,77,103,108)

A avaliação geral dos demais microorganismos detectados entre os dez mais prevalentes neste estudo, mostra que os demais resultados do exame citológico e microbiológico não são coincidentes e podem ser comparados somente quando relacionados em ordem decrescente de frequência, apesar da expectativa do clínico ou ginecologista, de que os exames de uma mesma paciente não apresentem resultados discrepantes ou incompatíveis. Essa expectativa justifica-se também pelo também

pelo fato de que os processos inflamatórios do trato genital na mulher são comuns, embora não sejam graves, e as pacientes muitas vezes voltam ao ginecologista devido à re-infecção, recidiva ou falha na resposta ao tratamento ou à auto-medicação. Nos casos orientados adequadamente, a experiência clínica reconhece que o tratamento é compensador. (38,110)

5.3 – O conhecimento do ecossistema vaginal aplicado à presença de lactobacilos no esfregaço:

Nesta amostra, a predominância de *Lactobacillus* foi verificada em 4.550 esfregaços (45,2 %) e em 866 (8,6 %) constituíam uma flora mista. Esses dados correspondem à flora tipo I e II de Schroeder, podendo-se relacionar a flora denominada “a menos patogênica”, tipo I, normal ou com inflamação, e a denominada “estágio intermediário”, tipo II, com inflamação ou com provável infecção em que estão ainda presentes o *Lactobacillus*. Foram realizadas 684 (15,0 %) culturas de pacientes com esfregaço citológico codificado como F1, que é o mesmo que flora tipo I, e 289 (33,3%) culturas de pacientes com esfregaço citológico codificado como F2, que é o mesmo que flora tipo II. Atualmente, o conhecimento da microflora e do ecossistema vaginal são indispensáveis para uma melhor compreensão desses resultados e também são necessários para a compreensão do papel das bactérias nas infecções vaginais. O conceito de ecossistema, que é a interação entre o meio vaginal e a microflora, assim como os conhecimentos sobre a BV e sobre a imunologia da vagina representam grandes avanços da Microbiologia e Imunologia do trato genital inferior feminino. (4,42,72,73,96,124)

A aplicação dos conhecimentos sobre o ecossistema vaginal em Citopatologia, explica em parte que - o afluxo de leucócitos em quantidade maior do que ocorre com as variações do ciclo menstrual, a aceleração da descamação do tecido epitelial, ou a citólise, e flora constituída por *Lactobacillus acidophilus*, observados comumente nos esfregaços - provavelmente representam o desequilíbrio do ecossistema decorrente dos

fatores endógenos ou exógenos conhecidos. A inexistência de agente infeccioso ou de cervicite entretanto, dificulta a explicação desses fenômenos pelos Microbiologistas, cujas publicações são geralmente dirigidas ao isolamento de algum agente etiopatogênico. Lira Neto (1984), estudando 118 pacientes com esfregaços citológicos apresentando esses fenômenos, concluiu que os bacilos não são a causa e sim o efeito; a exacerbação dos *Lactobacillus* decorre de condições que aumentam o teor de glicogênio epitelial como gravidez e fase luteínica do ciclo menstrual, uso de anovulatórios (42 pacientes) e anovulação crônica (47 pacientes) ou outras condições metabólicas e hormonais, de observação clínica; Lira Neto observou que essas pacientes podiam também manifestar sinais e sintomas clínicos exuberantes de citólise e há casos que são resistentes ao tratamento. Na literatura norte-americana, Cibley e Cibley (1991) fazem referência à **citólise**, que é a exacerbação do *Lactobacillus* com consumo do glicogênio citoplasmático das células epiteliais, um fenômeno primeiramente denominado “citólise de Doderlein”, depois citada por Bibbo, M. e Wied, G.M., como um achado comum no esfregaço citológico, reconhecido pela Citopatologia. Atualmente, é uma entidade clínica denominada Vaginose citolítica mas permanecem dúvidas se é uma entidade patológica porque muitas pacientes não apresentam queixas. Os estudos microbiológicos não produzem esclarecimentos e colocam dúvidas se apenas o *Lactobacillus* produz a citólise. Cibley e Cibley comentam ainda, que Bibbo não descreveu a citólise como achado clínico e que a denominação "citólise de Doderlein" talvez seja incorreta, sendo muito mais indicada Vaginose citolítica. Neste estudo, 320 (3,1%) pacientes apresentavam esfregaços citolíticos, com predomínio da citólise e *Lactobacillus* exacerbados mas com leucócitos ausentes ou escassos. A bactéria *Leptotrix vaginalis*, da família dos *Lactobacillus*, foi identificada com o exame citológico em 607 casos ou 6,0% do total da amostra e esteve associada à citólise em número não determinado de esfregaços. Apesar da escassez de publicações sobre *Leptotrix* e *Bacterionema sp.* registramos a ocorrência da espécie *Leptotrix vaginalis* amostra. (10,11,25,76)

A alteração da microflora interpretada por Shroeder como “estágio intermediário”, observada nesta amostra em 866 casos (8,6 %), indica que a predominância de *Lactobacillus* ainda não foi superada pela proliferação de outros microorganismos endógenos ou exógenos, que constituem o segundo componente dessa flora, visivelmente heterogênea, e que provavelmente, os mecanismos de defesa promovidos pelos *Lactobacillus* ainda estão atuando no ecossistema. A flora intermediária ou mista pode representar algum grau de preservação do ecossistema ou fase de transição entre o normal e o patológico, ou atrófico. O exame microbiológico nesses casos, identifica tipos de bactérias que podem variar nas amostras, dependendo da população estudada. Neste estudo, os micoplasmas genitais associados aos *Lactobacillus* compondo a flora tipo II foram identificados em 50,1% das 289 culturas, seguidos por estafilococos e estreptococos em 110 casos (31,1%); em 17 (5,8%), a *Escherichia coli*, 8 dos quais (2,7 %) associada também a micoplasmas; outras bactérias identificadas em 11 casos foram: *G. vaginalis*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Mobiluncus sp* e *Corynebacterium*. A prevalência do *Ureaplasma urealyticum* (142 casos-49,1%), está de acordo com a frequência dos micoplasmas genitais na nossa região Nordeste do Brasil, publicada por Teixeira et al.(1999), em estudo de correlação do exame citológico e microbiológico. (34,96,117)

Os patógenos identificados como parte da flora tipo II nesta amostra, provavelmente foram capazes de induzir à reação inflamatória representada no esfregaço citológico principalmente pelo exsudato, com maior ou menor número de neutrófilos, acompanhada por células epiteliais descamadas com pseudoeosinofilia e secreção de quantidade variável de muco cervical. A correlação do exame citológico com a cultura para micoplasmas genitais mostrou que a presença de inflamação significativa no esfregaço, facilmente podia levar à interpretação pelos dados de laboratório, de que eram agente de infecção. Nos casos em que as alterações inflamatórias eram discretas ao exame citológico, eram admissíveis outras hipóteses como colonização na genitália

externa, dúvidas que irão depender da interpretação do ginecologista. Uma flora tipo II constituída por *Lactobacillus* e micoplasmas genitais exacerbados não pode ser diagnosticada com a coloração de Papanicolaou mas a frequência do *Ureaplasma urealyticum* (49,1%) pode colocar o citopatologista diante da suspeita de que estão presentes nos esfregaços com flora tipo II associada à inflamação, e há necessidade de que sejam investigados para definir se são agentes de infecção, considerando-se que a patogenicidade dos micoplasmas é controversa. (62,114)

As publicações indicam que a colonização ou a infecção por micoplasmas resulta do contato sexual. Mc Cormack (1980) refere que o *M. hominis* e o *U. urealyticum* estão presentes na mucosa genital de mais de 50% dos adultos sexualmente ativos. E ainda, que a mulher é mais suscetível à infecção sintomática ou assintomática e por isso, é importante que a organização Family Health International tenha incluído os micoplasmas entre os agentes de doença sexualmente transmissível. Faibis et al. (1994) afirmam que os micoplasmas tiveram, na clientela do Institut Pasteur de Madagascar, uma parte de responsabilidade no aparecimento de cervicite porque o *M. hominis* foi identificado em 21,4 % e o *U. urealyticum* em 41,6 % dos casos. Teixeira et al. (1999) encontraram em Recife, frequência semelhante, de exacerbação dos micoplasmas genitais na cérvix e vagina de mulheres sexualmente ativas, representada pelo *U. urealyticum* em 53 % de 421 mulheres, 16 % *M.hominis* e 31% associados; esses autores salientaram a importância da avaliação semi-quantitativa em placa do número de colônias, para diferenciar colonização de exacerbação indicando os casos em que são agente de infecção e a correlação com o exame citológico também mostrou que a presença de micoplasmas no esfregaço é diferente da BV. Taylor Robinson (1998) definiu os micoplasmas genitais como causa de NGU e BV e ainda, como causa de parto prematuro, o que esclarece em parte, as controvérsias e confirmam que os micoplasmas são agentes etiológicos de doença inflamatória pélvica ou puerperal, que devem ser prevenidas. (15,27,36,112,113,114,116)

5.4 – A interpretação da flora bacteriana patogênica na ausência de *Lactobacillus*:

A flora tipo III de Schroeder, interpretada como “a mais patogênica” é comumente relacionada em Microbiologia com a Vaginose bacteriana, a BV. No esfregaço citológico, a presença de inflamação com exsudato e flora tipo III, em que estão ausentes as *clue cells*, podia ser relacionada com a especificação confusa de *Streptococce*-*Typ* ou *kokken-typ*, ou “bactérias cocóides”. Essa especificação já está em desuso e é inadequada porque se refere apenas ao aspecto morfológico de bactérias que não podem ser identificadas com a coloração de Papanicolaou. A indicação de “bactérias cocóides” era ainda frequentemente usada por exclusão, significando a presença de uma bactérias mal identificadas, ou na falta de especificação mais apropriada para a flora encontrada nas pacientes na menopausa ou pós-menopausa que apresentavam inflamação no esfregaço citológico, decorrente de alteração no ecossistema vaginal pela queda no nível hormonal, ou talvez causada por infecção. Correspondiam à codificação F3 para cocos e “cocóides” que pouco davam esclarecimento ao ginecologista, mas permaneceu a distinção entre F3 e F4, feita por Wied e Bibbo, F4 indicando somente a *Gardnerella vaginalis*. O Sistema Bethesda retirou apropriadamente, a especificação de cocos ou “cocóides” sem, no entanto, indicar se há necessidade de identificação com a cultura, das bactérias vistas nesses esfregaços associadas à inflamação. (11,34,47,75,117)

De acordo com os resultados desta amostra, 69 pacientes (0,6 %) apresentavam uma flora tipo III constituída por cocos patogênicos, em 51 casos (73,9%) identificados com a cultura: *Staphylococcus aureus* 27 (52,9 %), *Streptococcus spp.* (grupo D, não enterococo) 23 (45,1%) e *Neisseriae gonorrhoeae* 1 (1,9 %); Larsen e Galask (1980), afirmam que é difícil o consenso na literatura, sobre a presença dos cocos aeróbios devido à incompatibilidades na nomenclatura e na apresentação dos dados por diferentes

autores; o *Staphylococcus epidermidis*, não patogênico, é o mais comumente encontrado - em 12 a 92% das amostras - e o *Staphylococcus aureus* é encontrado em menor percentagem de pacientes, ou é encontrado na vagina durante a fase menstrual; os estreptococos que causam infecção do trato genital inferior feminino são ainda diagnosticados com base na hemólise dos grupos de Lancefield, com predomínio do α -hemolítico ou do grupo B, que tem relação com infecção neo-natal; o grupo D, enterococo, foi identificado por Larsen e Galask, em 36% de um grupo de pacientes e mostrou-se resistente a mudanças mais extremas no ambiente que os outros cocos; o grupo A não é frequente. Nesta amostra, a baixa incidência de *Neisseriae gonorrhoeae* (1 caso - flora tipo II e 2 casos flora tipo III) pode também ser relacionada com o declínio da infecção verificada em todo o mundo, com incidência de 0,3% de 3.985 pacientes e 3,2% de 6.603 pacientes, encontrada na África por Faibis et al. (1994) e Faye Kette et al.(1993) respectivamente. (36,37,50,71)

As bactérias morfologicamente "cocóides", foram identificadas em 380 (3,7%) casos, dentre estes, 222 (58,4 %) pacientes tinham mais de 50 anos. A cultura foi realizada em 47 (12,3%) casos e identificou 38 (80,8%) *U. urealyticum*, 6 (12,7%) *U. urealyticum* e *M. hominis* e 2 (4,3%) somente o *M. hominis*; outras bactérias com morfologia "cocóide" ao exame citológico foram 2 *Mobiluncus* e 1 *Lactobacillus*. Com relação as micoplasmas genitais, os achados desta amostra são semelhantes aos de Jones e Davson (1967), que descreveram pela primeira vez o *M. hominis* no esfregaço citológico, confirmado com a cultura em 24% de 233 pacientes, principalmente em esfregaços com proliferação bacteriana intensa em meio às células epiteliais; nos esfregaços com proliferação discreta, comentaram que o reconhecimento do *M. hominis* não era confiável e que havia crescimento de menor número de colônias na cultura. Os achados desta amostra também correspondem aos de Teixeira et al. (1999), que identificou um padrão microbiológico de exacerbação dos micoplasmas genitais diferente

da BV devido à ausência de *Gardnerella vaginalis* e de *clue cells*, ao exame citológico. (62,114,116)

A coloração de Papanicolaou, ou outra usada em Citopatologia, não permite identificar tipos de cocos, nem "bactérias cocóides", representadas muitas vezes por micoplasmas genitais, e orientar esses casos continuará a ser um problema, se não existir no laudo, especificação ou tópico, que indique a necessidade de diagnóstico com exame microbiológico, principalmente a cultura, nos casos em que não tenha sido solicitada a critério clínico. "Cocos", "cocóides" ou "cocobacilos" devem ser eliminados definitivamente, do laudo do exame citológico, de acordo com preceitos básicos de Microbiologia e com as seguintes conclusões de publicações atuais: a) Cocos são identificados ao exame direto, com uso da objetiva de grande aumento, nos seus dois grandes grupos: Gram positivos e Gram negativos, e não, com a coloração de Papanicolaou; b) Não foi ainda esclarecido pelos Microbiologistas, quais os tipos de estafilococos ou estreptococos mais frequentes e patogênicos para o trato genital feminino; c) O *Staphylococcus epidermidis* é o coco mais frequentemente encontrado na vagina e uma vez que não é patogênico, não é causa de infecção, e deve-se evitar que seja confundido com outro coco patogênico, quando visível com a coloração de Papanicolaou; d) A frequência dos micoplasmas genitais deve ser lembrada quando há uma flora morfológicamente "cocóide" ou uma flora sugestiva de cocos, o que não pode ser resolvido somente com a coloração de Papanicolaou; e) A proliferação dos micoplasmas genitais não deverá ser confundida com infecção por *N. gonorrhoeae* na prática do exame citológico, por citopatologista que reconheça os limites da coloração de Papanicolaou na identificação desse agente e considere que a gonorréia é atualmente menos frequente em todo o mundo, alcançada pela eficiência da antibioticoterapia no seu tratamento. (15,50,62,71,116)

De acordo com os resultados deste estudo, foi observada uma flora tipo III, patogênica, que não é BV e pode estar acompanhada de inflamação de intensidade

variável ao exame citológico, mas a sua etiologia poderá ser esclarecida somente com a cultura. Nos casos em que a cultura não tenha sido solicitada a critério clínico, essa informação poderá ser indicada no laudo de exame citológico para facilitar a aproximação entre os especialistas e evitar que haja discrepâncias entre os dois exames de laboratório, o que facilitará também, a decisão do ginecologista. Por outro lado, embora seja necessário um maior número de casos para confirmar as observações preliminares deste estudo, a presença de inflamação ou exsudato de neutrófilos e piócitos ao exame citológico poderá complementar a positividade da cultura, auxiliando a determinar a patogenicidade dos micoplasmas genitais e justificar a antibioticoterapia. Nos esfregaços tróficos ou atróficos com discreta proliferação de micoplasmas, a decisão sobre patogenicidade irá depender da interpretação do ginecologista.

(27,30,31,116)

Nos casos de infecções associadas é necessário investigação mais cuidadosa. Arya et al. (2000), avaliando a incidência do *M. hominis* e do *M. hominis* associado a outras infecções como BV, tricomonas, clamídia, verrugas genitais e cândida em 341 de 1.200 pacientes, salientam a importância de que as investigações sejam feitas por etapas, a partir da eliminação da influência dos agentes da infecção associada aos micoplasmas; esses autores encontraram dificuldades em determinar a patogenicidade e não observaram diferença estatisticamente significativa na resposta inflamatória representada pelo número de PMN nos esfregaços corados pelo Gram e pela leucorréia, nas pacientes positivas ou negativas para *M.hominis*. (5)

5.5 - Os estudos da BV e sua correlação com o exame citológico:

A Vaginose bacteriana – BV, que Gardner e Dukes (1954) denominaram Vaginite por *Haemophilus vaginalis*, descreveram suas características clínicas, o agente sexualmente transmissível e as características microscópicas da infecção, é atualmente reconhecida como entidade clínica e microbiológica, e é a infecção bacteriana

mais frequente no trato genital inferior feminino. A bactéria predominante, re-classificada com DNA homólogo em 1980, como *Gardnerella vaginalis*, é identificada com o Gram ou com cultura e também ao exame citológico, pela presença das *clue cells* ou "células guia". A identificação das bactérias anaeróbicas, que são cocos Gram positivos ou Gram negativos e que se associam à *Gardnerella vaginalis* na BV não tem aplicação prática porque são necessários equipamentos e técnicas sofisticadas. A identificação dos gêneros e espécies de bactérias anaeróbicas, constituindo a "síndrome polimicrobiana", seus produtos e a identificação bioquímica das aminas foram os principais conhecimentos acrescentados à descrição original da entidade. (12,34,43,44,105, 106,108)

Amsel et al. (1983) estabeleceram os critérios para o diagnóstico clínico, que foram adotados pela OMS, mas Sweet (2000) demonstra preocupação com a necessidade de que a BV seja diagnosticada: " Apesar dos riscos associados com a vaginose bacteriana e de sua alta prevalência na mulher em idade reprodutiva, a vaginose bacteriana continua a ser ignorada pelos clínicos, particularmente na mulher assintomática". Mais de 50% dos casos de BV são assintomáticos e mesmo as mulheres não demonstram preocupação com a BV. (4,111)

De acordo com Giacomini et al. (1997), o aspecto da BV é "típico e inequívoco, foi um dos primeiros descritos na citologia vaginal e em regra, associa-se ao quadro clínico". Descreve que o mais importante nesses esfregaços é o fundo coberto pela intensa proliferação bacteriana, com espaços ao redor das células epiteliais e, com maior aumento, a ausência de lactobacilos e a presença de *clue cells*, que são mais visíveis ao exame a fresco. (47)

Neste estudo, 1.197 pacientes (11,8 %) apresentaram a infecção por *Gardnerella vaginalis* vista no esfregaço citológico, 333 (27,8%) confirmados com a cultura. Ao exame citológico foram observados **dois aspectos microscópicos** distintos: 1) 832 (69,5 %) esfregaços apresentavam microscopia típica de BV; 2) 308 (25,7 %) esfregaços

apresentavam quantidade significativa de neutrófilos, piócitos e muco em meio à intensa proliferação bacteriana e às *clue cells*. A inibição da quimiotaxia dos leucócitos é a característica da BV que levou Spiegel (1983) a propor a denominação Vaginose bacteriana, ao invés de vaginite, para essa síndrome. Portanto, a BV acompanhada de exsudato difere do aspecto típico, dificulta o diagnóstico ao exame citológico e, para liberar o exame, o citopatologista recorre a observações imprecisas como "compatível com BV" ou "sugestiva de BV", que poderão influenciar até a decisão terapêutica. A presença do exsudato sugere que há outro agente, ou outros fatores responsáveis pelo afluxo de leucócitos, e talvez o ginecologista já tenha suspeita disso, mas na prática médica, a interpretação desses achados fica prejudicada se não for indicado que o exame microbiológico - a cultura, ou o Gram, deve ser realizado. (4,59,106,111)

Em vários trabalhos publicados e co-autorias, Spiegel (1980,1983,1983,1991) não faz referência a leucócitos ou quantidade de leucócitos vaginais na BV, nem mesmo quando inclui bactérias como *Mycoplasma hominis* e *Mobiluncus sp.*, como parte das bactérias que compõem a BV; também não descreveu se havia leucócitos nos casos em que observou infecção por coliformes, tricomonas e monília concomitante com a BV. Pheiffer et al. (1978) registraram leucócitos na BV. Holmes et al. (1981) referem que a presença de muitos PMN na ausência da *Trichomonas vaginalis* ou *C. albicans*, sugere cervicite devida a *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ou vírus HSV, ao invés de vaginite. Sweet (2000) refere que a cervicite não responde a tratamento até que a BV seja tratada. (4,43,59,94,106,107,111)

Neste estudo foram realizadas 279 culturas das 832 pacientes em que o esfregaço citológico era típico de BV. O resultado da maioria dessas culturas - 71,7% ou 200 casos, identificou unicamente a *Gardnerella vaginalis*. No restante, a presença de 35 *Ureaplasma urealyticum*, 6 *Mycoplasma hominis*, 32 (11,4%) *Candida sp.*, 4 (1,4%)*Trichomonas vaginalis*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Corynebacterium* e ainda, 18 imunofluorescências positivas para clamídia não modificaram significativamente as

características do esfregaço. Nos casos que não eram típicos porque apresentavam exsudato, a Microbiologia contribui decisivamente para confirmar a BV ou esclarecer a etiologia da infecção bacteriana concomitante, mas o exame citológico foi acompanhado da investigação da flora com cultura, somente em 54 (17,5%) dos 308 casos. As culturas das pacientes em que a *Gardnerella vaginalis* estava associada a exsudato mostraram 12 casos (22,2 %) com exacerbação dos micoplasmas genitais, 5 *Candida sp.* (9,2 %) e 1 *Mobiluncus sp.* (1,8 %); em 34 casos (62,9 %) foi identificada somente a *Gardnerella*. Nas pacientes em que somente a *G. vaginalis* foi identificada, é mais provável que o exsudato ou cervicite precedeu a BV e é possível que maior quantidade de neutrófilos e piócitos estejam presentes na secreção e no esfregaço citológico, quanto maior seja a intensidade ou a duração da cervicite. Nas pacientes com outros patógenos associados à BV, vistos ao exame citológico ou identificados com cultura, a conclusão é de que há dupla infecção: BV associada a *Candida sp.* ou à exacerbação do *Ureaplasma urealyticum*, neste estudo. (59,94).

A comparação dos dados mostra que a exacerbação dos micoplasmas genitais ocorreu mais frequentemente, sem alterar o aspecto microscópico característico da BV (12,3% de 333 culturas) do que nos casos com presença de exsudato (3,6% de 333 culturas). Metaplasia pode ser decorrente de cervicite e a cervicite é considerada pelos autores, a mais provável causa de aparecimento do exsudato na BV, mas nesta amostra, a metaplasia ocorreu com frequência aproximada nos dois grupos: 21,8% (182 casos típicos de BV) e 25,7 % (78 casos de BV com exsudato). A presença de exsudato nos casos de BV desta amostra, não mostrou associação significativa com a presença de *Candida sp.*, *Trichomonas vaginalis*, ou *Chlamydia trachomatis*, nem com alterações hormonais como o uso de anticoncepcional (22 pacientes) ou menopausa (16 pacientes). Estes resultados não devem, entretanto, sugerir que cervicite com ou sem metaplasia e proliferação de outros agentes patogênicos deixem de ser investigados nessas pacientes. É provável ainda, que a investigação clínica sobre DST prévia e sua

duração, comportamento sexual, influência hormonal, uso de DIU, falha de tratamento anterior ou auto-medicação possa acrescentar outros dados que possam ter relação com o aparecimento do exsudato na BV. A relação entre as bactérias anaeróbicas e o exsudato não é estudada. De acordo com Paavonem et al. (1986), critérios clínicos uniformes para vaginose bacteriana e cervicite muco-purulenta deverão ser usados em futuros estudos clínicos sobre de que maneira as duas condições estão interrelacionadas. O citopatologista poderá auxiliar a triagem dos casos em que a cultura não tenha sido solicitada a critério clínico. (47,59,90)

A associação da BV com infecção por outros patógenos tem sido registrada na literatura por Gardner e Dukes (1959), Pheiffer et al. (1978), Holmes et al.(1981), Spiegel (1983, 1991), Schnadig (1989) mas a atenção dos estudos para compreender a entidade é voltada principalmente para o papel do *Mycoplasma hominis* e *Mobiluncus sp.* que vem sendo incluídos como parte da flora patogênica que causa a vaginose bacteriana. A presença do *M. hominis* na BV é considerada uma associação independente em 24 a 75 % dos casos, mas é também encontrado em 13 a 20 % das mulheres normais. O *Mobiluncus sp.* adere às células epiteliais formando as *comma cells* descritas por Schnadig (1989) com o Gram e com a coloração de Papanicolaou; com a cultura, Biswas (1993) refere que o *Mobiluncus* é identificado em 14 a 96 % das mulheres com BV e em menos de 6 % dos controles. Taylor Robinson (1996) afirma que a vaginose bacteriana ocorre com ou sem sintomas como uma entidade distinta, não relacionada com a presença de outra infecção. Nesta amostra nota-se uma baixa incidência na cultura, dessas bactérias que são incluídas como parte da flora da vaginose bacteriana: o *M. hominis* identificado em 8 casos e *Mobiluncus* em apenas 1 caso. A possibilidade de as *clue cells* serem diferenciadas das *comma cells* (e das *pseudoclue cells*) ao exame citológico poderá levar ao aumento da frequência de *Mobiluncus* nas amostras. (12,44,59,94,101,106,108)

Avaliações comparativas vem estabelecendo a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, para os tipos de exames indicados para confirmar o diagnóstico de BV e ainda, por meio da correlação entre a cultura ou o Gram e os achados do exame de citologia cérvico-vaginal. Ao exame citológico, o aspecto típico de BV com *clue cells* presentes é semelhante ao que é visto no Gram e as avaliações vem mostrando que, para o diagnóstico de BV, o exame citológico é 88,7 % sensível, 97 a 98,8 % específico, com valor preditivo positivo de 88 a 94 % e valor preditivo negativo de 98,7 %, portanto confiável. O Sistema Bethesda mantém a especificação que corresponde à flora anteriormente codificada como F4, mas as discussões tem levado a modificações na especificação em cada conferência realizada: em 1988, o TBS adotou "microorganismos morfolologicamente compatíveis com espécies de *Gardnerella*", mas Giacomini e Schnadig discordaram justificando que a BV é uma síndrome polimicrobiana causada não somente pela *Gardnerella*; em 1991, o TBS adotou "predominância de cocobacilos compatíveis com alteração na flora vaginal" e em 2001, adotou "alteração da flora sugestiva de Vaginose". (12,46,47,54,58,95,101,117)

Com relação a essas incertezas, alguns comentários podem ser feitos a partir das observações deste estudo: a) uma especificação ou um termo deve ter sua validade confirmada com o seu uso na prática e o diagnóstico de BV em laboratório, baseia-se na identificação da *G. vaginalis* e das *clue cells* porque as bactérias anaeróbicas somente podem ser identificadas em laboratórios equipados para pesquisa; b) as *clue cells* representam a aderência da *G. vaginalis* às células epiteliais em número muito maior do que outras bactérias e quando estão presentes no exame citológico, a sensibilidade é de 90 % e especificidade 97 % para o diagnóstico de BV; c) denominações como "cocobacilos" são tão inadequadas quanto "cocóides" e nem poderiam ser empregadas para indicar outras bactérias responsáveis por infecção secundária à BV porque devem ser empregados métodos como a cultura para identificar esses patógenos, especialmente se modificam o aspecto típico da BV ao exame citológico; d) "alteração

da flora sugestiva de "Vaginose" não é adequado para indicar a BV com exame de laboratório, sem que o diagnóstico dessa entidade seja também indicado pelos sinais e sintomas clínicos que são os "critérios de Amsel". É adequado propor para o exame de citologia cérvico-vaginal a especificação: "infecção por *Gardnerella vaginalis*, com presença de "células-guia". (4,45, 47,117)

5.6 - A infecção por tricomonas e o papel da Citopatologia no seu diagnóstico:

A revisão bibliográfica leva a considerar a infecção por tricomonas, uma das primeiras doenças sexualmente transmissíveis conhecidas, sob dois aspectos: o primeiro deles, com relação ao registro das DST no mundo e o outro, com relação ao papel do exame citológico no diagnóstico da infecção por *Trichomonas vaginalis* no trato genital inferior feminino. (8,27,67)

Baldy, em 1985, referia que a denominação doenças sexualmente transmissíveis adotada na década anterior, significou uma mudança e uma ampliação do conceito de doença venérea porque a nova denominação estendeu-se às doenças com múltiplas manifestações, devidas a vários agentes que podem ser transmitidos durante o ato sexual. Assim, doenças como a hepatite, amebíase ou outras, podem ser transmitidas durante o contato sexual, além das venéreas clássicas, que ainda carregam a conotação repulsiva e o sentimento de culpa e peso por tê-las contraído, dificultando a abordagem médica e científica, tornando mais difícil interferir nas suas causas. Atualmente são incluídos pela organização Family Health International, microorganismos pouco conhecidos ainda, como agentes de DST, como o vírus HTLV-1 e 2, herpes humano tipo 8, Epstein-Baar, citomegalovírus, vírus do molusco contagioso, as bactérias *Calymmatobacterium granulomatis*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp*, e fungos ou protozoários como *Phthirus pubis* e *Sarcoptes scabiei*. As DST são doenças endêmicas, urbanas, atingem todas as camadas sociais, sua incidência continua a aumentar, mas a

primeira dessas doenças que se tornou de notificação compulsória é a AIDS. A recomendação da OMS, levando em conta essas particularidades das DST, é de que sejam intensificados os esforços no sentido da educação para a prevenção dessas doenças. (8,27,82)

A infecção por *Trichomonas vaginalis* sintomática ou assintomática atinge milhões de pessoas em todo o mundo mas algumas frequências encontradas na literatura demonstram as variações que ocorrem nas populações dos continentes: na África, 8,2 % no estudo de Faye Kette et al. (1993) com 6.603 pacientes e 10,2 % no estudo de Faibis et al.(1994) com 3.985 pacientes; no México, a infecção por tricomonas foi identificada por Sanchez Vega et al. (1993) em 3,13 % de 800 pacientes. Nesta amostra, a incidência de infecção por *Trichomonas vaginalis* foi de 1,3 % (133 casos), próxima da incidência encontrada na América Latina. (36,37,98)

As características da inflamação no esfregaço citológico e o aspecto histopatológico da agressão da *Trichomonas vaginalis* ao epitélio causando cervicite com congestão vascular foram descritas por Koss e Wolinska (1959). Nesta amostra, 133 (1,3%) pacientes apresentavam infecção por tricomonas dentre estas 55 (41,3 %) com inflamação purulenta e 40 esfregaços eram insatisfatórios para a avaliação oncológica. Nesses casos, a investigação clínica pode indicar possíveis causas da maior intensidade da inflamação como a duração da infecção, contaminação do parceiro, falhas de tratamentos anteriores especialmente auto-medicação. Entretanto, a investigação com a cultura, do papel de bactérias patogênicas associadas à infecção por tricomonas provocando o aparecimento de exsudato mais intenso não deve ser excluída. (65)

Uma observação comum na prática de exame citológico é que dificilmente é encontrada somente a tricomonas em meio ao esfregaço inflamatório e é visualizada uma maior ou menor proliferação de uma flora bacteriana que, modificada, ou mesmo sugerindo ser patogênica, não desperta muito a atenção, já que a tricomonas justifica a presença dos leucócitos e de outros sinais de inflamação. Nesta amostra o exame direto

(T+M) ou a cultura foram realizados em 32 pacientes e com a correlação entre o exame citológico e microbiológico, havia até 3 microorganismos por esfregaço incluindo as tricomonas. As bactérias patogênicas identificadas com a cultura foram: micoplasmas genitais 8 casos (57,1%), *Gardnerella vaginalis* 3 (21,4 %), *Escherichia coli* 2 (14,2 %) e *Staphylococcus aureus* 1 (7,1%); a *Candida sp.* foi confirmada em 4 casos. A associação da infecção por tricomonas com o *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e *Gardnerella vaginalis* também foi encontrada por Krigger et al. (1988) e com o *Staphylococcus aureus*, por Koss e Wolinska (1959). (65,67)

Este estudo está de acordo com as publicações que referem a utilização rotineira e prática, do exame citológico no diagnóstico da infecção cérvico-vaginal por tricomonas, que diagnosticou 75,9 % dos casos. Isso ocorre porque na prática de atendimento médico, a cultura para tricomonas torna-se desnecessária, é demorada enquanto que a identificação da *Trichomonas vaginalis* com o exame citológico apresenta as vantagens conhecidas e citadas por Krigger et al (1988), de ser "conveniente porque não há custo adicional". Além disso, quando o citopatologista observa que a inflamação presente no esfregaço é muito intensa ou há intensa proliferação bacteriana provavelmente patogênica, a identificação dessas bactérias com cultura poderá ser necessária se a cura clínica não for obtida após a eliminação das tricomonas pelo tratamento. (67,76,98)

A especificidade do exame citológico em diagnosticar *Trichomonas vaginalis* é avaliada em 95 a 97%, mas sua sensibilidade é discutida por causa do problema dos resultados falso-positivos, registrados pelos autores em 31% a 60 % das amostras. Na prática de exame citológico no nosso meio, também é comum o problema dos falsos-negativos porque podem ser encontradas em alguns esfregaços, estruturas que sugerem ser tricomonas mas apresentam alterações degenerativas e são impróprias para identificação, quer haja inflamação intensa, hemorragia, ou não. Nesses casos é necessário comunicar ao ginecologista, que o parasita deve ser pesquisado com exame

microbiológico, o mais indicado é o exame a fresco que chega a 92 % de sensibilidade com um observador experiente. (67,78)

5.7 - A infecção por *Candida sp.* a mais frequente nesta amostra:

A infecção por *Candida sp.* ou C V V, foi a mais frequente nesta amostra, encontrada em 1.785 casos (17,7 %), dos quais 74,7 % foram diagnosticados somente com o exame citológico, uma vez que a coloração de Papanicolaou permite a identificação do fungo nas suas formas fenotípicas e o exame termina sendo utilizado para o diagnóstico com as mesmas conveniências reconhecidas para o diagnóstico da infecção por tricomonas. O Sistema Bethesda mantém o tópico referente à identificação da *Candida sp.*, mas não foram encontradas na literatura, avaliações comparativas para determinar a sensibilidade ou especificidade do exame citológico no diagnóstico da infecção por *Candida albicans*, espécie isolada em 85 a 90 % dos casos, ou outras espécies do fungo. (117)

A vulvo-vaginite por *Candida sp.* ou C V V, que, nos Estados Unidos, é a segunda causa de infecção vaginal precedida apenas pela BV, ocorre em todo o mundo e sua frequência é avaliada por registros de diferentes autores como Faye-Kette et al.(1993) e Faibis et al.(1994) que encontraram frequências de 25 % em 6.603 pacientes e 27 % em 3.985 pacientes na África, e Sanchez-Vega et al.(1993), de 14,39 % em 800 pacientes no México, América Latina. Nesta amostra, a infecção por cândida ocorreu em 17,7 % de 10.064 pacientes, frequência relativamente menor que a encontrada no continente africano e aproximada dos dados do nosso continente latino-americano. (36,37,98,104,117)

A revisão bibliográfica mostrou que são conhecidas as formas clínicas da vulvo-vaginite por cândida – C V V, que são a colonização, infecção primária, secundária e recorrente e há interesse em estabelecer a relação entre o seu aparecimento e os fatores que atuam nas diferentes formas da infecção contribuindo para que seja mais ou menos

intensa. Esses fatores podem estar ligados: a) ao próprio fungo durante as fases do seu crescimento e desenvolvimento e são as hifas as formas mais agressivas à superfície epitelial; ou b) ao hospedeiro, principalmente sua imunidade, condições patológicas como diabetes mellitus e condições fisiológicas como gravidez, atividade sexual e c) ao uso de medicamentos como antibióticos, antimicóticos, corticóides, imunossuppressores, anti-concepcionais. Tais fatores são capazes de causar modificações iatrogênicas no microambiente vaginal, favorecendo a proliferação do fungo oportunista. Deve ser lembrado que o uso de medicamentos pode ser consequência da auto-medicação ou aquisição de medicamento sem receita médica. (60,72,97,103)

Neste estudo, foram observados ao exame citológico, **três aspectos microscópicos** principais:

1) a **colonização**, em que há presença de esporos de *Candida sp.* e de *Lactobacillus*, com ausência de leucócitos mas geralmente há exacerbação dos *Lactobacillus*.

2) a **infecção**, em que há esporos e pseudo-hifas ou hifas, *Lactobacillus* e leucócitos com maior número de neutrófilos; notamos comumente nesses esfregaços, que a presença ou ausência de muco pode ser um diferencial porque - se o muco é escasso ou ausente, observa-se leucocitoclasia com fragmentos dos núcleos dos leucócitos (neutrófilos), e os *Lactobacillus* exacerbados, esporos, psoudohifas e hifas aderidos à superfície das células epiteliais e - na presença de muco, há inflamação do tipo catarral tendo em meio leucócitos (com neutrófilos fragmentados ou não), *Lactobacillus* e as formas fenotípicas da *Candida sp.*

3) a **colonização ou infecção por *Candida sp.* associada a infecção bacteriana** com presença de flora provavelmente patogênica e alterações inflamatórias vaginais ou cérvico-vaginais. Lira Neto et al. (1985) refere algumas dessas observações como a exacerbação dos *Lactobacillus* e associação com outros microorganismos patogênicos. (77,104)

No entanto, não foram encontradas, na literatura consultada, descrições desses achados corriqueiros no esfregaço citológico, ao menos a presença das hifas, que são o sinal inequívoco de doença invasiva e foram encontradas nesta amostra em 817 casos- 45,7 %. Sonnex e Lefort (1999) do Addenbrooke's Hospital, em Cambridge, publicaram os achados microscópicos de 267 pacientes com *Candida sp.* e, em 182 casos (78%) positivos à bacterioscopia com o Gram e cultura, identificaram "apenas esporos" em 65 (28%) pacientes, "apenas hifas" em 16 (7%) e "esporos e hifas" em 101 (43%); a correlação dos exames de laboratório com os dados clínicos mostrou que 68% do total de 234 pacientes com cultura positiva eram sintomáticas, porém não foi possível estabelecer associação (s) entre a sintomatologia e a morfologia do fungo. (104)

No nosso país, durante a rotina diária dos laboratórios, é possível que a descrição dos achados de microscopia pareça de menor importância porque a identificação do fungo atende à necessidade de diagnóstico e de que a paciente receba tratamento imediato devido à exuberância do quadro clínico, tornando-se então preponderante em relação à observação das características da resposta inflamatória à *Candida sp.* na vagina e suas prováveis relações com a recidiva e a recorrência. Assim o exame citológico que na C V V, realiza o exame microscópico da secreção vaginal de maneira semelhante ao exame a fresco, deixa de ser avaliado se contribui de fato, para que o clínico defina se há colonização ou infecção (doença invasiva), ou se o exame citológico é capaz de sugerir que há necessidade de investigar com cultura, a presença de infecção bacteriana associada à infecção por *Candida sp.*, nos casos em que não tenha sido solicitada a critério clínico. Sonnex e Lefort (1999) comentam que a experiência do microscopista pode ser relevante, como também a acuidade da microscopia. (36,37,77,98,104)

De acordo com a correlação entre o exame citológico e 451 exames microbiológicos (cultura ou T+M) realizados nas pacientes com C V V desta amostra, havia até 4 microorganismos por esfregaço. A colonização e a infecção foram

diagnosticadas em 1.519 (85,0 %) esfregaços citológicos com *Candida sp.*, 265 (17,4%) correlacionados com a cultura. Os *Lactobacillus* foram identificados em um total de 331 pacientes (80,3%) que apresentavam CV V ou C V V e infecção bacteriana. As bactérias patogênicas identificadas com 127 culturas (28,1%) foram: *Ureaplasma urealyticum* 57 (41,6 %), *M. hominis* 1 (0,7 %), *Gardnerella vaginalis* 42 (30,6 %) , *Escherichia coli* 20 (14,6 %), *Staphylococcus aureus* 6 (4,3 %), *Streptococcus sp.* 5 (3,6 %), *Klebsiella* 4 (2,9 %), e *Proteus sp* 2 (1,4 %). A infecção concomitante por *Candida sp.* e *Trichomonas vaginalis* ocorreu em 12 casos. (Já foram referidas anteriormente as associações com BV e tricomonas)

Nas infecções vaginais, algumas publicações vem registrando que, com exceção da BV, há acúmulos de macrófagos, linfócitos e granulócitos no lúmen vaginal, que representam a resposta inflamatória à modificação do ecossistema ou aos patógenos exógenos mas em geral, os autores apenas citam esses achados, sem descrever o que observam nos esfregaços. Os estudos modernos com material de lavado vaginal avaliado por citometria de fluxo parecem não despertar muito interesse e apresentam resultados quantitativos, sem descrever as características do processo inflamatório que podem ser vistas ao microscópio óptico. Além disso, Microbiologistas pesquisam micróbios, conseqüentemente a quantidade e o tipo de leucócitos presentes nas infecções vaginais e / ou cervicais não estão no foco das suas atenções e por isso esperam que citopatologistas se posicionem com relação a esses problemas. Com relação á vulvo-vaginite por *Candida sp.*, as afirmações de Sobel (1989) e Witkin (1991), de que a C V V é caracterizada pela ausência de neutrófilos, ou que os PMN não apresentam quimiotaxia para o lúmen vaginal são surpreendentes porque não correspondem aos achados dos esfregaços citológicos dos casos de infecção por *Candida sp.*; também não correspondem aos esfregaços que apresentam bactérias patogênicas associadas ou esfregaços com flora tipo I e inflamação. Ao exame citológico de rotina, é comum

observar que a ausência de neutrófilos e de outros leucócitos na infecção por *Candida sp* relaciona-se apenas com a colonização. (29,30,56,77,91,97,103,123)

Na literatura, as atenções estão voltadas para a C V V como modelo para os recentes estudos sobre imunologia da vagina porque o interesse sobre a relação da infecção com indivíduos imunodeprimidos vem se desenvolvendo relacionado com o interesse pela AIDS. Os estudos de imunologia da vagina, por sua vez, são realizados com técnicas de imunohistoquímica com marcadores para linfócitos, o que não leva a esclarecer as controvérsias com relação à presença dos neutrófilos. A presença de exsudato de neutrófilos, ou eosinófilos, que observamos na rotina de exame citológico, deve ser investigada e avaliada como sinal de inflamação aguda ou alérgica, da infecção por *Candida sp.*, com sinais e sintomas clínicos também agudos. As controvérsias devem ser adequadamente investigadas no sentido de desenvolver o conhecimento sobre a importância da fase aguda e da fagocitose em relação à resposta imune celular, que é mecanismo de defesa contra a infecção por cândida na vagina. Rodgers e Beardall (1999) incluem os granulócitos quando afirmam que na C V V, a defesa é promovida tanto pela células T como por LT citotóxicos, *natural killer* e macrófagos, como pelos mecanismos de defesa mediados pelos granulócitos. A contagem de leucócitos vaginais feita por Hill e Anderson (1992) mostrou que aumentam para $2 \text{ a } 3 \times 10^5$ na infecção por fungos, nas fases proliferativa e peri-ovulatória, constituídos na sua maioria por macrófagos e granulócitos, com LT presentes, LB ausentes e, após tratamento, desapareceram tanto os leucócitos como as hifas. (56,97,125)

A relação da quantidade de leucócitos vaginais com as fases do ciclo menstrual é também conhecida pela Citopatologia, foi descoberta e descrita inicialmente por Papanicolaou como Citologia Hormonal, antes da introdução da Citologia Oncótica Vaginal e do seu êxito na prevenção do câncer ginecológico. O exame de citologia hormonal foi substituído pelas dosagens modernas dos hormônios no sangue, mas o

conhecimento do esfregaço citológico normal, que inclui a avaliação quantitativa dos leucócitos vaginais, ainda é a base a partir da qual poderá ser estabelecida a quantidade anormal de leucócitos que ocorre nas inflamações e infecções genitais como a C V V, cujo conhecimento vem sendo enriquecido recentemente pela Imunologia. A maior frequência da C V V na fase luteínica pré-menstrual e na gravidez já está relacionada à capacidade de reação da cândida aos hormônios esteróides através de receptores, associada à inibição da proliferação de linfócitos dependente dos macrófagos e mediada pela progesterona. (1,26,31,99,124)

A revisão bibliográfica mostra ainda que a C V V é registrada pela sua alta prevalência mas poucos autores como Faye-Kette et al. (1993) e Faibis et al. (1994) registraram sua associação com infecção por bactérias ou tricomonas, observações que são semelhantes à desta amostra e fazem parte do atendimento de inúmeras pacientes com sinais e sintomas ginecológicos que são submetidas a exames de laboratório - citopatológico e microbiológico. Com base nos estudos de imunologia da vagina, a C V V depende da imunidade celular e conseqüentemente, ocorre quando há falha nesse mecanismo de defesa. Quando a C V V se apresenta associada à infecção bacteriana, a proliferação das bactérias, que é regulada tanto pela imunidade humoral como pela imunidade celular, favorece a proliferação da cândida pelo comprometimento dos mecanismos de defesa e pelas características do fungo, que é um oportunista típico, sexualmente transmissível. Essas afirmações reforçam a necessidade de que esses conhecimentos que vem sendo adquiridos beneficiem as pacientes na prática, no sentido de que a C V V seja adequadamente diagnosticada e tratada, evitando-se suas recidivas e recorrências, que significam comprometimento ainda maior dos mecanismos de defesa vaginais. (36,37,77,123,124)

5.8 - A infecção por clamídia, nesta amostra:

A sensibilidade 5,3 a 38 ou 95% e especificidade de 4,5 a 75 ou 95 %, do exame de citologia cérvico-vaginal no diagnóstico de clamídia mostram que as avaliações de diferentes autores variam amplamente, são controversas e justificam a decisão do Sistema Bethesda de retirar a especificação referente à *Chlamidia trachomatis* do laudo do exame citológico. A frequência da infecção detectada no colo uterino de mulheres assintomáticas em idade reprodutiva, citada na literatura, é 5 a 15 % ou 8 a 40 % mas Kiviat et al. (1985) refere que a relação entre a colposcopia, citologia e a cultura não foi avaliada e as alterações histopatológicas também são pouco estudadas. Paavonen et al. (1986), afirmam que a histopatologia da cervicite por clamídia é caracterizada por intenso infiltrado com formação de folículos linfóides no estroma. (19,22,23,48,63,91,117)

Nesta amostra, 94 (0,9%) pacientes apresentavam infecção por clamídia e somente 9 esfregaços apresentavam alterações de células epiteliais ao exame citológico, que sugeriam clamídia, mas a imunofluorescência não foi solicitada nesses casos. A clamídia foi diagnosticada em 85 (90,4%) pacientes com a imunofluorescência, que é um método específico. Além do exame citológico preventivo e da pesquisa de clamídia com imunofluorescência, a cultura da secreção vaginal de 80 (85,1%) pacientes foi também solicitada a critério clínico. O resultado das culturas mostrou 44 (46,8%) casos de infecção por clamídia associada a micoplasmas genitais ou bactérias patogênicas, 11 (13,7%) associada ainda a *Candida sp.* Esses dados da frequência de clamídia nesta amostra, são também um exemplo de que especialistas atuam individualmente gerando resultados que parecem contraditórios para pesquisa, mas são esses resultados que retornam ao Ginecologista responsável pelo tratamento das pacientes. Os estudos e pesquisas, por sua vez, devem apontar falhas e procurar soluções e saídas possíveis. A falta de correlação do exame citológico com outros métodos de diagnóstico de clamídia são comparáveis às dificuldades que ocorrem no diagnóstico de HPV, quando os resultados apresentam contradições entre o exame clínico e colposcópico, o exame citológico e a biópsia. (2,19,23,33,40,63)

A incidência de clamídia, encontrada com o exame citológico em 9 de 10.064 pacientes nesta amostra, aproxima-se da incidência encontrada por Campos et al. (1986) com o exame de citologia cérvico-vaginal e imunofluorescência, em 40 pacientes de um total de 30.000 amostras; a associação com outras infecções foi encontrada por Cavalière et al. (1993) em 123 de 130 casos, 10 com HPV e, neste estudo, em 44 de 94 casos. A associação da infecção por clamídia com outras infecções é portanto, frequente na prática médica e provavelmente dificulta a avaliação da etiologia da cervicite. (19,23)

A revisão bibliográfica mostra que o microorganismo clamídia é conhecido pelas suas características microbiológicas, ciclo reprodutivo e seus antígenos, estes identificados por imunofluorescência e por ELISA. A infecção do trato genital feminino causa cervicite que poderá ser do tipo muco-purulenta, a MPC, que parece iniciar-se nas células do epitélio colunar da endocérvice, pela afinidade da clamídia com a célula cilíndrica. A infecção pode evoluir para doença inflamatória pélvica e de gravidez tubárica após cicatrização de salpingite assintomática por clamídia. Em outros casos, a DIP não gonocócica por clamídia atinge o feto tornando-se um fator de mortalidade peri-natal, ou a infecção atinge o recém-nascido com manifestações oculares e pulmonares. (16,48,55)

O papel da citopatologia no diagnóstico de clamídia é incerto mas a possibilidade de indicar infecção por clamídia é discutida desde que Naib (1970) Gupta (1979) e Shiina (1985) descreveram as alterações citológicas que relacionaram com clamídia. Kiviat et al. (1985) sugeria que a clamídia deve ser pesquisada quando - um maior número de neutrófilos, de linfócitos transformados (imunoblastos e células dos centros germinativos) e de 30 ou mais histiócitos com aumento de 400 vezes em três campos adjacentes - está presente no esfregaço citológico. No entanto, ao exame citológico, a infecção parece ser rara e por isso, um longo prazo parece ser necessário para que uma boa casuística seja obtida e avaliada adequadamente. Na literatura, as publicações de Campos et al. (1986) e Cavaliere et al. (1993), do Instituto Adolfo Lutz no Brasil,

preenchem esses requisitos de investigação continuada, das alterações citológicas em correlação com os métodos imunológicos de diagnóstico da clamídia. Com microscopia eletrônica, em 15 pacientes do National Naval Medical Center em Bethesda, positivas com ELISA, Henry et al. (1993) demonstrou presença da clamídia somente nas inclusões do tipo nebuloso de Shiina. De acordo com o Sistema Bethesda, indicações como essas não representam bases seguras de diagnóstico da *Chlamidia trachomatis* com a Citopatologia. (19,23,48,55,63,117,126)

5.9 – A Citopatologia no diagnóstico da intensidade e localização das inflamações - dificuldades e possibilidades:

Em meados da década de 50, as publicações de George Wied, discípulo de Papanicolaou, destacavam a citologia exfoliativa como uma técnica com precisão diagnóstica adequada e de valiosa aplicação prática em Ginecologia e Obstetrícia, que podia ser utilizada na localização e diferenciação das reações inflamatórias. Wied comentava que, durante a primeira consulta ginecológica, é geralmente difícil acertar a extensão e o tipo de reação inflamatória, ou decidir se a reação é aguda ou crônica, discreta ou avançada, difusa, ou localizada na vagina, cérvix e endocérvice. Seus estudos definiram que, com a citologia exfoliativa era possível diferenciar as reações inflamatórias em:

- 1- Reação inflamatória localizada na vagina
- 2- Reação inflamatória localizada na cérvix
- 3- Reação inflamatória localizada na endocérvice
- 4- Reação inflamatória difusa
- 5- Reação inflamatória aparentemente moderada
- 6- Reação inflamatória aparentemente acentuada
- 7- Reação inflamatória aparentemente aguda
- 8- Reação inflamatória aparentemente crônica.

Para isso, era indispensável uma colheita adequada do material para o esfregaço citológico e exame microscópico baseado na quantidade e estado de preservação dos leucócitos, e na presença de alterações degenerativas ou "atípias inflamatórias" das células epiteliais. Wied e Bibbo estabeleceram ainda, os agentes de inflamação ou de infecção visíveis com a coloração de Papanicolaou e que fizeram parte da codificação de F1 a F11, até que tiveram início os *workshops* que originaram o Sistema Bethesda de reavaliação da Citopatologia. (9,11,117,122)

De Wied até os nossos dias, a trajetória de sucesso do exame citológico cérvico-vaginal seguiu a direção dos demais exames citológicos dos deferentes órgãos e cavidades, no sentido de detectar lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, a colposcopia tornou-se um meio clínico de visualização macroscópica mais detalhada da mucosa do colo uterino e vagina, e manteve-se a ênfase nas lesões causadas pelo vírus HPV. A Microbiologia, por sua vez, ampliou seus conhecimentos científicos sobre o trato genital inferior feminino e agentes de infecção ou de doenças sexualmente transmissíveis, as DST, com o uso de técnicas específicas e, para o diagnóstico de cervicite, foram determinados critérios internacionais de diagnóstico para uso na prática, nos esfregaços corados com o Gram. (39,64,66,89,96,109,118,121).

A “categoria que compreende alterações que são reativas, em resposta a fatores tais como inflamação ... (e) inclui alterações reparativas”, ou “alterações que são de natureza benigna, associadas com inflamação incluindo reparação típica, atrofia com inflamação (vaginite atrófica)” são definições ou o significado de **reativo**, **reparativo** ou **alterações celulares benignas (*benign_cellular changes* — **BCC**)**. Estão incluídas na lei norte-americana CLIA 88, a Clinical Laboratory Improvement Act e no The Bethesda System, com recomendações para *rescreening*. Young e Kline (1994) comentam que essas alterações são comuns nos laboratórios de citologia, mas consideram que essas definições são ambíguas e interrogam: “Qual é o grau de alterações reativas e reparativas que se associa com inflamação?” “Quais alterações estão além do limite normal

e são BCC ou –de fato- o que é normal?” Young e Kline (1994) acrescentam ainda, que BCC deveria ser colocada na agenda para uma futura conferência em Bethesda. (80, 121,126)

O diagnóstico das inflamações cérvico-vaginais ou da leucorréia baseia-se no tripé: **história clínica, exame físico e testes laboratoriais** que são o exame a fresco, exame citológico e exames microbiológicos. As discussões sobre esse tema são consideradas atuais, não importa em que ano sejam publicadas. Com relação ao exame citológico, as conclusões de Wied podem parecer minuciosas e inaplicáveis na prática, mas não foram completamente esquecidas nos arquivos porque certamente, é impossível ignorar os leucócitos (neutrófilos, piócitos, histiócitos), as alterações inflamatórias das células epiteliais e os agentes de infecção na secreção vaginal e no esfregaço, embora não se saiba ao certo o que fazer com eles. Durante a rotina, quando o citopatologista julga ser conveniente informar ao clínico a intensidade da inflamação, o esfregaço citológico é adequado a essa avaliação pela sua riqueza de material: Koss (1989) refere que o esfregaço citológico tem, em média, 50.000 a 300.000 células e pode chegar a meio milhão de células para análise; de acordo com Berek (2003) o esfregaço citológico convencional deveria ter de 8.000 a 12.000 células epiteliais bem preservadas e bem visualizadas; Lira Neto (1985) refere também o "excelente detalhe morfológico dado pela coloração de Papanicolaou" na identificação de inflamação e de determinados agentes. (9, 38,66,77)

A potencialidade do exame citológico na avaliação microscópica da inflamação presente na secreção vaginal encontra, entretanto, importantes dificuldades à sua aplicação no atendimento médico-ginecológico e o primeiro desses obstáculos é o reconhecimento pelos especialistas. Consequentemente, a falta de reconhecimento dificulta a utilização do exame e o estabelecimento de políticas públicas que incluam o exame citológico como recurso para o diagnóstico e controle de DST no atendimento ginecológico e pré-natal, sem excluir a prevenção do câncer ginecológico. Nos Estados

Unidos atualmente, é comum que a inflamação não seja registrada no laudo do exame citológico. Young e Kline (1994) comentam que o diagnóstico e *follow up* de BCC nos EUA variam tanto, que a comunicação entre o citopatologista e o clínico é essencial. No Brasil, como a maioria dos citopatologistas é também anátomo-patologista, o conhecimento dos processos patológicos nos tecidos e da classificação das inflamações são aplicados nos esfregaços com inflamação ou infecção e são comuns conclusões no laudo, como Cervicite com metaplasia, Cervicite muco-purulenta, Endocervicite, Inflamação intensa, conclusões que podem ser incluídas como Recomendações, conforme o formato do laudo do Sistema Bethesda. Outro obstáculo para os especialistas é a falta de padrões de contagem de leucócitos e de critérios para comparação durante a rotina em casos de dúvidas, capazes de fazer com que as conclusões ou os diagnósticos citológicos, ao invés de carregarem a conotação "subjettiva", que é depreciativa, passassem a ser vistos como dependentes do conhecimento e da habilidade do observador, do citopatologista. (2,8,38,86,122,126)

Os fatores que influenciam o número de leucócitos e a flora bacteriana no esfregaço cérvico-vaginal podem ser distribuídos em três grupos: 1) **O ciclo hormonal**, 2) **Fatores não relacionados com infecção** e 3) **Infecções**. No esfregaço normal, a percentagem e o tipo de células epiteliais descamadas na secreção vaginal, acompanhadas dos leucócitos, eram descritos nos exames de citologia hormonal, nas fases do ciclo: estrogência, pré-ovulatória ou ovulatória, luteínica e pré-menstrual ou menstrual. Atualmente, a quantidade de células epiteliais descamadas e de leucócitos no esfregaço vaginal normal poderá ser re-avaliado utilizando medida ou técnica de precisão que atenda às exigências científicas modernas como a análise morfométrica ou ainda, a citometria de fluxo. E a Citopatologia é a especialidade médica mais adequada para definir o padrão de contagem dessas células, considerando as variáveis inter-relacionadas do efeito dos hormônios e da imunidade. (26,29,56,57,120)

Os fatores não relacionados à infecção, citados por Cooper e Sonnex (1993) são: AHO, gravidez, parto, atrofia pós-menopausa, intercurso sexual, pólipos, ectrópio e alguns dispositivos anti-concepcionais; Bibbo et al. (1976) citavam: lesão traumática, diminuição da acidez vaginal, atrofia, irradiação e neoplasia. Todos esses fatores devem ser considerados durante o exame e causam inflamação que varia de intensidade em cada caso, mas o citopatologista encontraria extrema dificuldade se exigências científicas determinassem ser necessário estabelecer padrões de contagem de leucócitos em relação a cada uma dessas variáveis; além disso, nesses casos, o interesse maior é que seja confirmada a ausência de infecção e que a paciente seja tratada adequadamente. (11,26)

A revisão bibliográfica mostrou que os microbiologistas utilizam critérios baseados na contagem de leucócitos para diagnosticar cervicite (21 a 30 neutrófilos - PMN - por campo com aumento de 400 vezes em 10 campos em média na bacterioscopia com o Gram, ou 10 ou mais PMN por campo com aumento de 1.000 vezes para o diagnóstico de cervicite) e para diagnosticar inflamação densa, ou intensa (30 ou mais PMN por campo de 1.000 vezes, que corresponde a 50%, ou mais de 50%, das células epiteliais do esfregaço citológico obscurecidas pelos leucócitos). Esses critérios são internacionais, foram estabelecidos com métodos práticos de contagem por campo ou por percentagem para determinar o padrão de leucócitos em relação à localização e intensidade da inflamação, e podem servir de modelo na Citopatologia moderna. O diagnóstico de inflamação intensa já é indispensável para avaliar as amostras insatisfatórias, atendendo às exigências do Sistema Bethesda. Mas atualmente, são raramente publicados estudos como o de Lawley et al. (1990) da Universidade de Washington, que avaliou 596 pacientes Classe I, propondo os seguintes critérios de inflamação:

- 1+ Focal, não obscurece o esfregaço
- 2+ Focal, PMN leve a moderado

3+ Moderada: Difusa, não obscurece o esfregaço ou obscurece até 10% do esfregaço

4+ Intensa: Difusa, obscurece 10 a 99% do esfregaço. Prejudica o exame, prejudica x% do esfregaço, ou Insatisfatório (18,30,73,89,109,110)

Essa margem de 10 a 99% é muito ampla para inflamação intensa, sendo preferível o percentual de 50% das células do esfregaço citológico obscurecidas pelos leucócitos, mais fidedigno em relação ao que comumente é observado na prática médica. Em estudos posteriores, as características das infecções devem ser determinadas em correlação com a biópsia, descritas e conhecidas até agora, apenas para casos de tricomonas e HPV. (18,26,30,63,65,83,110,126)

Neste estudo, as inflamações foram avaliadas conforme sua intensidade, em **leves** – 1.242 casos (12,3 %), **moderadas** - 6.664 casos (66,2 %) e **intensas** - 749 casos (7,4 %). Outros achados, em 1.409 pacientes (14,0 %) foram esfregaços normais (1 089 pacientes - 10,8%), citolíticos e atrofia sem inflamação em pacientes pós-menopausa.

A análise do resultado de 171 culturas de 749 pacientes que apresentavam inflamação intensa mostrou infecção de causa bacteriana em 35 casos (20,4 %), *Candida sp.* 20 casos (11,7%) *Trichomonas vaginalis* 4 casos (2,3 %) e 2 (1,1 %) com infecção concomitante por cândida e tricomonas. A frequência de inflamações bacterianas foi maior que a exacerbação dos micoplasmas genitais, identificados em 21 casos (12,2%), e esse achado está de acordo com as controvérsias sobre a sua patogenicidade: apesar de frequentes nesta amostra., os micoplasmas genitais não foram a principal causa de inflamação intensa encontrada.

O resultado dessas culturas mostrou ainda inflamação intensa mas sem infecção diagnosticada em 32 casos (18,7%) e cultura negativa em 28 (16,3 %), somando 60 casos (35,0 %) em que o acompanhamento clínico ou a repetição da cultura são necessários para esclarecimento e para que a paciente seja adequadamente tratada.

5.10- A infecção genital ao exame citológico e a atualização dos tópicos do laudo referentes aos agentes identificados com a coloração de Papanicolaou

A literatura mostra que a infecção cérvico-vaginal ao exame citológico é um tema cercado de expectativas com relação à acuidade diagnóstica e, conseqüentemente, ao seu reconhecimento. Cooper e Sonnex (1993) comentam que "a maioria dos laboratórios de Citologia notará a presença de algumas alterações inflamatórias quando examina um esfregaço mas pode não ser capaz de comentar sua causa básica" pela "falta de correlação entre o laudo citológico e o resultado da cultura"; por outro lado, acrescentam que "basear o tratamento somente na evidência de infecção com o esfregaço de Papanicolaou é uma das causas de falha no tratamento." Uma das maneiras de enfrentar essas dificuldades e superar o desafio é que os resultados dos exames citológico e microbiológico sejam correlacionados antes que os laudos sejam expedidos, como foi realizado neste estudo, em benefício das pacientes, o que também favorece a comunicação do laboratório com o ginecologista. (2,26,30,31,32,45,58,80,12)

A identificação de determinados microorganismos com o exame citológico, em geral corado pelo método de Papanicolaou, é realizada com técnica semelhante à bacterioscopia ou exame direto - a fresco ou corado com o Gram - e em várias ocasiões, os três tipos de exames chegam ao mesmo resultado, não havendo necessidade de repetição. A coloração pelo Gram tem a vantagem de classificar bactérias nos dois grandes grupos - Gram positivas e Gram negativas e favorece muitas vezes, que o microbiologista treinado identifique espécies ou decida qual o meio de cultura mais apropriado para ser utilizado. Na prática, como os ginecologistas brasileiros não são habituados a realizar o exame a fresco, a bacterioscopia da secreção vaginal termina sendo realizada por meio do exame citológico com a conveniência de que, na mesma ocasião, é feita também a prevenção do câncer ginecológico, cuja periodicidade não é sempre controlada pelos médicos ou pelas pacientes. Na investigação propedêutica da

leucorréia, a cultura é o método de maior acuidade diagnóstica para bactérias e outros microorganismos, identificados pelo crescimento das colônias e classificação em espécies. Solicitada a critério clínico, a cultura representou 94,8 % do total de 2.254 exames microbiológicos realizados nesta amostra. (2,27,30,31,32,83,86)

Para que seja definida a situação da Citopatologia em relação á propedêutica das inflamações e infecções genitais, é indispensável estabelecer os limites da coloração de Papanicolaou na identificação de microorganismos presentes no ecossistema vaginal normal ou alterado. Neste estudo, as bactérias "não classificadas" em 377 (3,7%) exames citológicos, foram especificadas somente quando a cultura foi solicitada em 152 casos: *Escherichia coli* 65 (42,2%), *Klebsiella sp.* 9 (5,8%), *Proteus sp.* 3 (1,9%), *Mobiluncus sp.* 3 (1,9%), *Corynebacterium* 5 (3,2%), *Lactobacillus* 1 (0,6%), *Ureaplasma urealyticum* 7 (3,2%) e *Mycoplasma hominis* (1,9%) ; o resultado da cultura pode ainda ser negativo, o que foi verificado em 60 casos (38,9%) ou porque não foi solicitada pelo clínico, a cultura para micoplasmas genitais, ou devido a inflamação intensa, hemorragia, flora escassa ou outro motivo, e é necessário que os especialistas decidam se a cultura deve ser repetida, nesses casos. Essas exemplos de bactérias que não podem ser identificadas pela coloração de Papanicolaou, quer sejam visíveis ou apresentem proliferação discreta, mostram que esses casos só poderão ser encaminhados se for incluído o tópico "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico", ou "Alteração da flora a esclarecer", que é uma indicação mais segura do que "não classificada", utilizada anteriormente no Brasil. Assim, o citopatologista comunica que há necessidade de investigar os casos suspeitos de infecção, ou permite que o ginecologista possa depois concluir que a inflamação é devida a outros fatores endógenos ou exógenos, ou seja, em todo caso em que a solicitação da cultura possa resultar em benefício para a paciente. (11,77,118)

A avaliação teórica e prática de microorganismos ao exame de citologia cérvico-vaginal foi realizada neste estudo para que cada especificação possa ser acompanhada

da sua respectiva justificativa e foi acrescentado o tópico que indica a pesquisa microbiológica como se segue:

Lactobacillus sp.

Bactérias com características de *Actinomyces sp.*, ou *Leptotrix vaginalis*.

Gardnerella vaginalis com presença de "células guia"

Trichomonas vaginalis

Fungos com características de *Candida sp.*

Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico

Efeito citopático por vírus - HPV

Outros (se possível,especificar)

As justificativas são:

a) *Lactobacillus sp.* são o principal componente da microflora vaginal e são identificados com o exame citológico, sem necessidade de cultura, a não ser nos casos pós-tratamento para controle de cura. *Lactobacillus* ou *Lactobacillus acidophilus* foi o resultado de 684 ou 31,5% do total de 2.169 culturas solicitadas a critério clínico. Estavam presentes em esfregaços normais, em "esfregaços citolíticos" ou como flora tipo I - normal, ou tipo II de Schroeder - flora intermediária ou mista acompanhadas de inflamação. Assinalando *Lactobacillus sp.* e o tópico "Alteração na flora a esclarecer com exame microbiológico" o citopatologista pode comunicar ao clínico a necessidade de investigação de uma flora mista com a cultura.

b) O Sistema Bethesda manteve a especificação de *Actinomyces spp.* que são bactérias também chamadas Leptotrix; Dois tipos de leptotrix são encontrados na vagina: os *Lactobacillus* que são *Leptotrichia* e *Actinomyces* que são *Bacterionema*. As pacientes que apresentam *Leptotrix vaginalis* ou *Actinomyces sp.* são submetidas a tratamento com antibióticos. Na revisão bibliográfica raras publicações fazem referência a essas bactérias, seu significado ou frequência.

c) A especificação de *Gardnerella vaginalis* é possível sempre que estejam presentes as "células guia", enquanto que Vaginose bacteriana ou ainda, Vaginose, é um diagnóstico clínico e laboratorial e não somente laboratorial. A sensibilidade e especificidade das "células guia", ao exame citológico, avaliada e publicada por diferentes autores, é em torno de 90% e o valor preditivo positivo de 75 a 100%.

Nos casos em que há cervicite ou provavelmente, há outra infecção associada, alterando a microscopia típica de BV pela presença de leucócitos e piócitos, ou exsudato, o citopatologista poderá indicar a necessidade de cultura assinalando o tópico "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico". Nesta amostra, a cultura não foi solicitada nesses casos, a critério clínico, em 254 pacientes (21,2%) e deixou de ser indicada pelo citopatologista pela falta do tópico correspondente.

Não é possível identificar com a coloração de Papanicolaou, o *Mycoplasma hominis*, incluído por Spiegel como parte da flora da BV, mas deve-se considerar a possibilidade de serem identificadas com objetiva de grande aumento, as *comma cells* descritas por Schnadig ao exame citológico, na infecção por *Mobiluncus sp.*

c) A especificação de *Trichomonas vaginalis*, indicada pelo Sistema Bethesda, é de aceitação praticamente universal devido à descrição da infecção por Koss e Wolinska (1959) ao exame citológico e histopatológico. São publicados nos EUA, índices de 31 a 60% de falso-positivos ao exame citológico e essa é uma das razões que caracterizam o exame a fresco como melhor para identificar tricomonas, com a vantagem de perceber a mobilidade do protozoário. A sensibilidade do exame a fresco depende de que o observador seja experiente e a identificação das tricomonas ao exame citológico também depende da colheita do material e do treinamento do citopatologista. Quando são encontradas estruturas com alterações degenerativas, que sugerem tricomonas, resultando em falso-negativos o clínico deve ser informado para que esses casos sejam investigados. O desaparecimento de sinais e sintomas clínicos relacionados à infecção

por *Trichomonas vaginalis* pode ainda depender da cura de infecção bacteriana associada, investigada de acordo com a orientação médica.

d) A especificação de *Candida sp.* também faz parte dos tópicos do laudo do Sistema Bethesda e é de aceitação praticamente universal, mas não foram encontradas referências bibliográficas com avaliações da sensibilidade e especificidade do exame citológico no diagnóstico do fungo. As descrições dos achados microscópicos no esfregaço citológico, presentes nas formas clínicas de colonização ou de doença, em que as hifas agredem e invadem o epitélio, também não são publicadas. Os achados deste estudo contradizem as afirmações de que é típica a ausência de PMN nas formas clínicas de doença: a ausência de leucócitos é típica da colonização. Comumente estão presentes *Lactobacillus sp.* exacerbados associados à *Candida sp.* e ambos devem ser assinalados nos seus tópicos. Nos casos em que a cândida prolifera associada a reação inflamatória por provável infecção bacteriana, isso poderá ser indicado assinalando-se a "*Candida sp.*" e "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico".

e) O tópico "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico" é proposto com este estudo, para substituir "cocos", "cocóides", "bacilos", "cocobacilos" ou "flora não classificada", nos casos em que há provável infecção bacteriana primária, associada ou não a lactobacilos, ou associada a outro microorganismo especificado nos demais tópicos do exame citológico cérvico-vaginal. Ao assinalar "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico", o citopatologista conclui que a identificação do (s) agente (s) ultrapassa os limites da coloração de Papanicolaou, mas deve ser identificado através de exame (s) microbiológicos (s). Consequentemente, evita resultados discrepantes entre o resultado dos exames citológico e microbiológico, facilitando a interpretação do caso pelo ginecologista e beneficiando a paciente.

f) De acordo com o Sistema Bethesda, não é recomendável que a Citopatologia comprometa-se com o diagnóstico de clamídia, ao ponto de existir tópico referente à clamídia no laudo, até que pesquisas esclareçam sua frequência e a relação do exame de

citologia cérvico-vaginal com os métodos modernos de diagnóstico e o exame histopatológico, bem como a frequência das infecções associadas. A *Chlamydia trachomatis*, e outros achados raros de agentes biológicos responsáveis por inflamação no esfregaço citológico como eventuais ovos de vermes, incluem-se na especificação "Outros" do Sistema Bethesda, podendo constar em "Recomendações", a critério do citopatologista, que seja investigada a causa de cervicite ou endocervicite.

g) Em geral, no Brasil, consideramos ainda, que a prática de “tratar e repetir” não é condenável - desde que não seja abusiva - e representa o acompanhamento da paciente pelo citopatologista e pelos demais especialistas responsáveis pelo caso, auxiliando a avaliar a eficácia do tratamento. É recomendável que a paciente retorne aos mesmos médicos, nos casos em que não é previsível a cura imediata.
(9,27,35,46,68,69,79,81,102,117,126)

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A Citopatologia é uma especialidade relativamente nova, que se desenvolveu no século XX, e o exame de Citologia Oncótica Vaginal é o que alcançou o maior êxito na luta contra o câncer, salvando incontáveis vidas nos diferentes países ricos ou pobres do planeta.

Outros benefícios, resultantes da conclusão da presença de afecções ginecológicas como inflamação, atrofias, infecção, DST, no esfregaço, não são devidamente registrados e por isso são desconhecidas quantas doenças inflamatórias pélvicas ou puerperais foram evitadas, quantas vezes patógenos presentes no esfregaço citológico foram confirmados microbiologicamente e puderam ser eliminados após tratamento, ou quantas vidas na fase intra-uterina ou neo-natal também já foram salvas. Essa prática médica solidária, que faz parte da rotina dos Citopatologistas e / ou Patologistas brasileiros, não pode dispensar os conhecimentos atualizados da Microbiologia, nem as exigências de acuidade que os exames complementares devem ter para esclarecer ou confirmar as observações clínicas. Uma vez que se apresentou a oportunidade - pouco comum - de contar com material para fazer a correlação do resultado do exame citológico com exames microbiológicos, especialmente a cultura, realizamos este trabalho esperando que seja útil e possa contribuir para atualizar conhecimentos e para que o exame de citologia cérvico-vaginal seja reconhecido não somente pela eficiência na realização do seu objetivo primário. Para que os agentes biológicos visíveis com a coloração de Papanicolaou e indicados no laudo, atendam aos requisitos de acuidade diagnóstica, as especificações para o laudo do exame de citologia cérvico-vaginal foram avaliadas comparando os resultados deste estudo com as publicações de outros autores e a especificação que indica a necessidade de pesquisa com a Microbiologia foi incluída para melhorar a comunicação com o clínico e beneficiar a paciente.

7.0 - CONCLUSÕES

7.0 - CONCLUSÕES

1 - Para a realização do exame citopatológico é indispensável que o clínico ou ginecologista envie ao citopatologista os dados solicitados na requisição, completos e que seja obtida uma amostra adequada durante a colheita do material.

2- O exame citológico e microbiológico mostrou prevalência de *Lactobacillus sp*, *Candida sp.* e *Gardnerella vaginalis*.

3 - O esfregaço cérvico-vaginal corado pelo método de Papanicolaou atende à necessidade de diagnóstico de inflamações cérvico-vaginais na população brasileira e tem precisão científica suficiente para detectar *Lactobacillus sp.*, *Leptotrix vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, e a infecção por *Candida sp.* primária ou adquirida.

O diagnóstico de *Gardnerella vaginalis* é seguro, desde que esteja presente no esfregaço, a "célula guia", enquanto que Vaginose é um diagnóstico clínico e laboratorial.

A codificação F1 a F11 não deve mais ser usada.

4 - São também visíveis: *Actinomyces spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus sp.* e possivelmente, *Mobiluncus sp*, além do efeito citopático pelo HPV e HSV. Esses microorganismos podem ser indicados na especificação "Outros" e, a critério do Citopatologista, com comentários em "Recomendações", conforme o laudo proposto no Sistema Bethesda.

5 - Nos casos em que a flora presente, associada ou não a lactobacilos, ultrapassar os limites de conclusão ao exame citológico, deve-se chamar a atenção no relatório, para que seja realizada a pesquisa microbiológica. É recomendável que a paciente seja informada de que isso se faz em seu benefício.

6 - Como consequência do nosso estudo, propomos as seguintes modificações no sub-ítem INFECÇÕES, adotado pelo Sistema Bethesda, com relação às especificações para microorganismos:

Manutenção do ítem *Lactobacillus sp.*

Substituição de "Alteração da flora compatível com Vaginose" por *Gardnerella vaginalis* com presença de "células guia".

Inclusão do ítem "Alteração da flora a esclarecer com exame microbiológico"

8.0 - ANEXOS

8.0 - ANEXOS

ANEXO I:

Nome: _____

Idade _____ Data da última menstruação: _____

Filhos _____ Aborto: _____

Resumo clínico: _____

Dados colposcópicos: _____

Tratamento em uso: Anticoncepcional () Radioterapia ()

 Creme vaginal () Cirúrgicos ()

 Antibiótico () Hormônios ()

 Outro ()

Data da colheita: _____

Médico requisitante: _____

ANEXO II:

Idade: _____

Data da última menstruação: _____

Atividade sexual: _____

Uso de medicamentos: _____

Sintomas ou queixas: _____

9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

9.0 – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ABREU E LIMA, M. C. C. O Sistema Bethesda versão 2001 – para o diagnóstico citológico cérvico-vaginal: grandes acertos e pontos polêmicos. Jornal da Sociedade Brasileira de Cancerologia. Ano IX,nº 39,nov / dez, 2001.
- 2- ALVES, V.A.F.,LIMA, M.A.N.,UTAGAWA, M.L., MAEDA, M.Y.S. Programa de controle de qualidade em citologia ginecológica do Instituto Adolpho Lutz: estratégias e análise critica dos resultados de sua implantação-piloto. Rev.Ass.Med.Bras.37(1): 36-42,1991.
- 3- AL-MUSHRIF, S., ELEY, A., JONES, B. M. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobic may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. J.Med.Microbiol. 49 (11):1023-1030, 2000.
- 4- AMSEL, R.,TOTTEN, P.A.,SPIEGEL,C.A.,CHEN,K.C.S., ESCHENBACH, D., HOLMES, K K. Nonespecific vaginitis: diagnostic criteria and epidemiologic associations. Am. J. Med 74:14-22,1983.
- 5- ARYA,O.P.,TONG,C.Y.W.,HART,C.A.,PRATT,B.C.,HUGHES,S.,ROBERTIS,P.,KIRBY, B., HOWEL, J., MC CORMICK, A., GODDARD, A.D. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? Sex. Transm Infect. 77 (1):58-72, 2001.
- 6- ASHFAQ,R., THOMAS, S., SABOORIAN, M. H. Efficiency of P A P N E T in detecting infectious organisms in cervicovaginal smears. Acta Cytolol.40 (5):885-888, 1996.
- 7- AUSTIN, R .M., MC LENDON, W. W. The Papanicolaou smear - Medicine's most successful cancer screening procedure is threatened. [Editorial]. JAMA 277(9):754-755-1997.
- 8- BALDY, J .L.S. Doenças infecciosas e parasitárias transmitidas por contato sexual: aspectos epidemiológicos e de saúde pública Rev Ass. Med. Bras.31(9/10):146-151, 1985.
- 9- BEREK, J.S. Simplification of the Bethesda 2001 classification system Am. J.Obstet.

- Gynecol. 188 (3 Suppl):S2-5; discussion S6-7, 2003.
- 10- BIBBO, M., HARRIS, M.J. Leptotrix. [Letter to Editor]_ Acta Cytol. 16 (1):2-4,1972.
 - 11- BIBBO,M.,HARRIS,M.J.,WIED,G.L. Microbiology and inflammation of the female genital tract in Compendium on diagnostic Cytology. 4th edition. Tutorials of Cytology, Chicago, Illinois,1976. p.61-75.
 - 12- BISWAS, M.K. Bacterial vaginosis_ Clin.Obstet. Gynecol. 36 (1):166-176,1993.
 - 13- BLACKWELL, A.L.,PHILLIPS, I., FOX, A. R., BARLOW, D. Anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis): clinical, microbiological and therapeutic findings. Lancet II (8359): 1379-1382,1983.
 - 14-BORIS, S., BARBÉS, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens (Review). Microbis Infect. 2 (5):543-546, 2000.
 - 15- BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. Mycoplasmas (Mollicutes) & Cell Wall- Defective Bacteria in Jawetz Melnick & Aldelberg`s Medical Microbiology 21th edition. Appleton & Lange, 1998. p.299-303.
 - 16- BROOKS,G.F.,BUTEL,J.S.,MORSE,S.A Chlamydiae in Jawetz, Melnick & Alderberg`s Medical Microbiology. 21th edition. Appleton & Lange, 1998. p.310-318.
 - 17- BROWN, W.J. Variations in the vaginal bacterial flora. Ann. Intern.Med. 96 (6 pt2): 931-934,1982.
 - 18- BRUNHAM, R.C.,PAVOONEM, J.,STEVENS,C.,KIVIAT, N., KUO,C.,CRITCHLOW,C., HOLMES, K.K. Mucopurulent cervicitis - the ignored counterpart in women of urethritis in men. N.Engl.J.Med. 311(1):1-6,1984.
 - 19-CAMPOS, E. P., MAEDA, M.Y.S., SHIH, L., W. S., PACHECO, G. R., ALVES, V. A. F. Rastreamento de alterações morfológicas atribuíveis a clamídias em 30.000 amostras de esfregaços vaginais. Rev. Inst. Adolfo Lutz 46 (1/2):59-64,1986.
 - 20-CARRERA, J. M.,DEXUS JR.,S.,COUPEZ, F.Tratado y atlas de colposcopia. 2^a edición Salvat Editores AS, Barcelona,1977.
 - 21-CATTAPAN, A Vaginose bacteriana com especial atenção ao *Mobiluncus sp* Revisão.

- Rev. Bras. Doenças Sex. Transm.1 (1):23-33,1996.
- 22- CAUDILL, J. L., HUMPHREY, S. K., GOELLNER, J. R. Cervicovaginal cytology and the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*: a comparison with immunofluorescent results Diagn.Cytopathol. 11:20-22,1994.
 - 23- CAVALIERE, M. J., MAEDA, M.Y.S., SHIRATA, N. K., LONGATTO FILHO, A., SHIH, L. W. S., SIQUEIRA, M., CORREA, M. G. B. M., OLIVEIRA, H. F. Cérvico-vaginal *Chlamydia trachomatis* infection in pregnant adolescent and adult women: a morfologic and immunofluorescent study. Arch. Gynecol.Obstet. 253 (4):175-182,1993
 - 24- CHAVES, E. Lesões precursoras do câncer de colo do útero. J.Bras.Ginec.96 (6):235-237,1986.
 - 25- CIBLEY, L.J., CIBLEY, L.J. Cytolytic vaginosis. Am. J.Obstet.Gynecol. 165 (4pt2):1245-1249,1991.
 - 26 -COOPER, P., SONNEX, C. Inflammatory cervical smears. (Special report) Practitioner 237 (1532):816-818,1993.
 - 27- DALLABETA, G., LAGA, M., LAMPTEY, P. Controle das DST: Uma prioridade de Saúde Pública in Controle de doenças sexualmente transmissíveis: Manual de planejamento e coordenação de programas. Rio de Janeiro. Te Corá Editora / Associação Saúde da Família (AIDSCAP/ Brasil.Family Health International),1997.323p.
 - 28- DUNKELBERG, W.E. Diagnosis of *Haemophilus vaginalis* vaginitis by direct Gram-stained smears. Am. J. Obstet Gynecol. 91(7):998-1000,1965.
 - 29- DRAPPER, D.L., LANDERS, D.V., KROHN, M.A., HILLIER, S., WIESENFELD, H. C., HEINE, R.P. Levels of vaginal secretory leucocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections. Am. J. Obstet. Gynecol. 183 (5):1243-1248, 2000.
 - 30- ECKERT, L. O., KOUTSKY, L. A., KIVIAT, N. B., KRONE, M. R., STEVENS, C. E., ESCHENBACH, D. A. The inflammatory Papanicolaou smear: what does it means ? Obstet. Gynecol. 86 (3):360-366,1995.

- 31- EDWARDS, S.K., SONNEX, C. Influence of genital infection on cervical cytology. Sex. Transm. Inf. (Original article) 74:271-273,1998.
- 32- ELTABBAKH, G.H., ELTABBAKH, G.D., BROEKHUIZEN, F.F., GRINER, B.T. Value of wet-mount and cervical cultures at the time of cervical cytology in assymptomatic women. Obstet. Gynecol. 85 (4):499-503,1995.
- 33- ELUF-NETO, J. ,NASCIMENTO, C.M.R. Cervical cancer in Latin América Sem.Oncol. 28(2):188-197,2001.
- 34- ESCHENBACH, D. History and review of bacterial vaginosis_ Am.J. Obstet.Gynecol. 169 (2pt2) :441-445,1993.
- 35 -EVANS, D.M.D., HUDSON, E.A., BROWN,C.L.,BODDINGTON, M.M.,HUGHES, H.E., MACKENZIE, E. F., MARSHALL, T. Terminology in Gynecological Cytopathology: report of the Working Party of the British Society for Clinical Cytology (Review article) J. Clin. Pathol: 39:993-944,1986.
- 36- FAIBIS, F.,PECARRERE, J. L. MENARD, D. Étude de 3985 prélèvements genitaux féminins effectués au Centre de Biologie Clinique de l'Institut Pasteur de Madagascar. Arch. Inst. Pasteur Madagascar 61 (2):105-107,1994.
- 37- FAYE-KETTE, Y.H., KOUASSI, A. A., SYLLA-KOKO, D. F., KAKOU - N'DOUBA, A., AKOUKA-KOFFI,G., ACHO,Y.B., CISSE, L.,BOUZID, S.A., KOUAOU, K., DOSSO, M. Prévalence de quatre agents des maladies transmises sexuellement au cours des leucorrhées à Abidjan (Côte d'Ivoire). Bull.Soc.Path.Ex .86:245-247,1993.
- 38- FLEURY, F.J. Adult vaginitis. Clin.Obstet.Gynecol.24:407-438,1981.
- 39- FRABLE, W. J. Integration of Surgical and Cytopatholgy : a historical perspective [Editorial] Diagn. Cytopathol. 13 (5):375-378,1995.
- 40- FRANCO, E.L.F. A epidemiologia do câncer no Brasil. Médicos HC-FMUSP Ano II. 7:96-100,1999.
- 41- FREIBERG, J. Genital mycoplasma infections_ Am.J.Obstet.Gynecol.132 (5): 573-578,1978.

- 42- FRIEDRICH, E.A. The vagina: an ecologic challenge_ Ariz. Med.36: 443-445, 1979.
- 43- GARDNER, H.L., DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol 69:962-976,1955.
- 44- GARDNER, H.L., DUKES, C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis_ Ann. NY Acad. Sci. 83(2):280-289,1959.
- 45- GIACOMINNI, G., PAVOONEM, J., RILKE, F. Microbiologic classification of cervico vaginal flora in Papanicolaou smear. Acta Cytol.33(2):276-278,1989.
- 46- GIACOMINI, G., SCHNADIG, V. J. The cervical Papanicolaou smear: bacteria infection_and the Bethesda System. Acta Cytol. 36 (1):109-110,1992.
- 47- GIACOMINI, G., CALCINAI, A., MORETTI, D., CRISTOFANI, R. Accuracy of cervical / vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. Sex. Transm.Dis. 25 (1):24-27, 1997.
- 48- GIAMPAOLO, C., MURPHY,J., BENES,S., MC CORMACK, W.M. How sensitive is the the Papanicolaou smear in the diagnosis of infections with *Chlamydia trachomatis* ? Am. J. Clin. Pathol. 80,844-849.1983.
- 49- GIRALDO, P.C., WITKIN,S.S.Candidíase vaginal: um desafio incompreendido_ J.Bras. Doenças Sex.Transm.10 (5):31-36,1998.
- 50- GONÇALVES, A.A.G., ALCÂNTARA,M.F.L.P., SILVA,L.A. Incidência de gonorréia em população previdenciária da Baixada Santista. Rev.Bras.pat.Clin.20 (2):47-52,1984.
- 51- GORBACH, S .L., MENDA, K .B., THADEPALLI, H., KEITH, L. Anaerobic microflora in healthy women_ Am.J. Obstet. Gynecol.117 (8):1053-1055, 1973.
- 52- GUIJION, F., PARASKEVAS, M., RAND, F., HEYWOOD, E., BRUNHAM, R., M. C. NICOL, P. Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of cervical intraepithelial neoplasia. Int. J. Gynecol.Obstet. 37 (3):185-191,1992.
- 53- HAMILL, H.A. Normal vaginal flora in relation to vaginitis. Obstet. Gynecol. Clin. North Am. 16 (2):329-336, 1989.
- 54- HAY, P.E., TAYLOR-ROBINSON, D. Defining bacterial vaginosis: to BV or not to BV

- BV, that is the question [Editorial review]. Int. J.STD AIDS 7:233-235,1996.
- 55- HENRY, M.J., JENSEN, K. L. M., SKOLUND, C.D., ARMSTRONG, D. W. *Chlamydia trachomatis* in routine cervical smears: a microscopic and ultrastructural analysis. Acta Cytol. 37 (3):343-352,1993.
 - 56- HILL, J. A., ANDERSON, D. J. Human vaginal leukocytes and the effects of vaginal fluid on lymphocyte and macrophage defense functions. Am.J.Obstet.Gynecol.166:(2): 720-726,1992.
 - 57- HILLIER, S.L., KROHN, M.A., RABE, L.K., KLEBANOFF, S.J., ESCHENBACH, D.A. The normal vaginal flora H₂O₂ producing Lactobacilli and Bacterial vaginosis in pregnant women. Clin. Infect.Dis 16 (4) Suppl.:273-281,1993.
 - 58- HILLIER, S.L. Diagnostic microbiology of Bacterial vaginosis. Am.J. Obstet 169 (2pt2): 455-459,1993.
 - 59- HOLMES, K. K., SPIEGEL, C., AMSEL, R., ESCHENBACH, D. A., CHEN, K. S. C., TOTTEN, P. Nonespecific vaginosis. Scand. J. Dis. Suppl. 26:110-114,1981.
 - 60- HURLEY, R., DE LOUVOIS, J. Candida vaginitis. Postgrad.Med.J .55:645-647,1979.
 - 61- IGETISIEME, J. U., ANANABA, G.A., BOLIER, J., BOWERS, S., MOORE, T., BELAY, T. LYN, D., BLACK, C.M. The intercellular adhesion molecule type-1 is required for rapid activation of helper type-1 lymphocytes that control early acute phase of genital chlamydial infection in mice. Immunology 98 (4):510-518,1999.
 - 62- JONES, D.M., DAVSON, J. *Mycoplasma hominis* in Ayre's smears. Nature 213:828-829,1967.
 - 63- KIVIAT, N., PAVOONEM, J., BROCKWAY, J., CRITCHLOW, C.W., BRUNHAM, R.C., STEVENS, C. E., STAMM, W. E., KUO, C., DE ROUEN, T., HOLMES, K. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. I. Epithelial and inflammatory cellular changes. JAMA 253 (7):989-996,1985.
 - 64- KLINE, T. S. The Papanicolaou smear: a brief historical perspective and where we are today. Arch. Pathol.Lab Med.121:205-209,1997.

- 65- KOSS, L.G., WOLINSKA, W.H. *Trichomonas vaginalis* cervicitis and its relationships to cervical cancer: a histocytological study. *Cancer* 12:1171-1193,1959.
- 66- KOSS, L.G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection: a triumph and a tragedy. (Review) *JAMA* 261(5):737-743,1989.
- 67- KRIEGER, J.N., TAM, M.R., STEVENS,C.E., NIELSEN, I.A, HALE, J.H. KIVIAT,N.B., HOLMES, K.K. Diagnosis of trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures and monoclonal antibody staining of direct specimens. *JAMA* 259:1223-1227,1988.
- 68- KRIEGER,P., BIBBO,M. Our journey towards improved accuracy in Cytology: the role of new technologies. [Editorial]. *Acta Cytol.* 41(1):11-14,1997.
- 69- KURMANN, R.J., SALOMON, D. The Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytologic diagnosis: definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. 1th edition.1994. Springer-Verlag New York Incorporation .81p.
- 70- KURMANN, R.J., HENSON, D.E., HERBST, A L., NOLLER, K.L., SCHIFFMAN, M. H. Interim guidelines for management of abnormal cervical cytology. *JAMA* 271(23): 1866-1869,1994.
- 71- LARSEN, B., GALASK, R.P. Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance *Obstet. Gynecol.* 55 (5) Suppl.:100-113,1990.
- 72- LARSEN, B.,GALASK, R.P.Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann. Intern. Med* 96 (2): 926-930,1982.
- 73- LAWLEY, T.B., LEE, R.B., KAPELA, R. The significance of moderate and severe inflammation on Class I Papanicolaou smear. *Obstet. Gynecol.*76 (6): 997-999, 1990.
- 74- LEHKER, M. W., SWEENEY, D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases and motility. *Sex Transm.Infect.* 75 (4):231-238,1999.
- 75- LEPPALUOTO,P. A. The etiology of cocci type "Streptococckentyp" vaginal smears. *Acta Cytol.*15 (3):211-215,1971.
- 76- LIRA NETO,J.B.Leucorréia causada por exacerbação dos bacilos de Dodelein.*J.Bras.*

- Ginec. 94 (3):67-71,1984.
- 77- LIRA NETO, J.B. Achados colpocitológicos em 1787 casos de vaginites. J. Bras. Ginec. 95 (11e 12):529-535,1985.
- 78- LOSSICK, J. G. The diagnosis of vaginal trichomoniasis [Editorial] JAMA 259 (8):1230, 1988.
- 79- LUFT, R.D. The Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytologic diagnosis: Report of the 1991 Bethesda Workshop. Hum. Pathol. 23 (7):719-721,1992.
- 80- LUFF, R.D. Benign cellular changes: have we inadvertently reinvented the Class I sign-out? Diagn. Cytopathol. 10 (4):309-310,1994.
- 81- MALIK, S.N., WILKINSON, E.J., DREW, P.A., HARDT, N.S. Benign cellular changes in Pap smears. Causes and significance. Acta Cytolol. 45 (1):5-8,2001.
- 82 - MASSAD, E. Epidemiologia matemática. Médicos HC-FMUSP Ano I 3:76-81,1998.
- 83 - MOHERDAUI, F., VUYLSTEKE, B., SIQUEIRA, L.F., DOS SANTOS JÚNIOR, M. Q., JARDIM, M. L., DE BRITO, A. M., SOUZA, M. C., WILLERS, D., SARDINHA, J. C., BENZAKEN, A. S., RAMOS, M.C., BUENO, H., RODRIGUES, L.G., CHEQUER, P.J. National programme on STD / AIDS Ministry of Health, Brasília, Brasil. Validation algorithms for the diagnosis of sexually transmitted diseases in Brazil: results from a multicentric study. Sex. Transm. Dis. 74 Suppl.1: S38-43,1998.
- 84- MONTZ, F.J., MONK, B.J., FOWLER, J.M., NGUYEN, Natural history of minimally abnormal Papanicolaou smear. Obstet. Gynecol. 80 (3pt1):385-388,1992.
- 85- MOUNT, S.L., PAPILILO, J.L. A study of 10.296 pediatric and adolescent Papanicolaou smears diagnosis on Northern New England. Pediatrics 103 (3):539:545,1999.
- 86- NASCIMENTO, C.M., ELUF-NETO, J., REGO, R.A. Pap-test coverage in São Paulo municipality and characteristics of the women tested. Bull. Pan. Am. Health. Organ. 30 (4):302-312,1996.
- 87- NICAND, E., CAVALLO, J.D., CRENN, Y., MEYRAN, M. Valeur du score au Gram dans le diagnostic des vaginosis bactériennes. Path. Biol. 42 (5):539-543,1994.

- 88- NUGENT, R. P., KROHN, M. A, HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain nterpretation. J.Clin. Microbiol.29:297-301,1991.
- 89- OLLAYOS, C.W. Update on Papanicolaou smear: new issues for 1990s. Mill. Med. 162:521-523,1997.
- 90- PAAVOONEM, J. Physiology and ecology of the vagina. Scand.J. Infect.Dis. Suppl. 40:31-35,1983.
- 91- PAAVONEM, J., CRITCHLOW, C. W., DE ROUEN, T., STEVENS, C. E., KIVIAT, N., BRUNHAM, R.C., STAMM, W.E., KUO,C., HYDE, K. E.,COREY, L., HOLMES, K. K. Etiology of cervical inflammation. Am.J.Obstet.Gynecol.154 (3): 556-564, 1986.
- 92- PAPANICOLAOU, G.N., TRAUT, H.F. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. Arch. Pathol. Lab. Med.121:211-224,1997.
- 93- PETINELLI, E., GRECO, M. K., ORTEGA, X. R., MORA, M. J., SAEZ,E. F. Analisis, classification microbiologica y valoration de raciones inflamatorias de 25.000 extendidos citologicos de cuello uterino. Rev.Chil. Obstet.Ginecol.49 (1):26-32,1984.
- 94- PHEIFER, T. A., FORSYTH, M. S., DURFEE, M. A., POLLOCK, H.M., HOLMES, K. K. Nonespecific vaginitis - Role of *Haemophillus vaginalis* and treatment with metronidazole. N. Engl. J. Med. 298 (26):1429-1434,1978.
- 95- PLATZ-CHRISTENSEN, J. J., LARSSON, P.G., SUNDSTROM, E., BONDESON, L. Detection of Bacterial Vaginosis in Papanicolaou smears. Am. J. Obstet. Gynecol. 160 (1):132-133,1989.
- 96- REDONDO-LOPEZ, V., COOK,R.L., SOBEL,J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. Rev. Infect.Dis.12 (5): 856-872,1990.
- 97- RODGERS,C.A., BEARDALL, A.J. Recurrent vulvovaginal candidiasis: why does it occur ? Int. J.STD AIDS 10 : 435-441,1999.
- 98- SANCHEZ-VEGA ,J.T.,TAY-ZAVALA,J., RUIZ-SANCHEZ,D., RUIZ-HERNANDEZ,A.,

- ROBERT-GUERRERO, L, FERNANDEZ-PRESAS, A.M, MARTINEZ, S. Frecuencia de tricomoniasis y candidiasis vaginal y su relación con el cuadro clínico. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 35:211-216,1993.
- 99- SAUMANN, A. B. Los orígenes del Papanicolaou. Rev.Chil. Obstet. Gynecol. 57 (6): 461-463,1992.
- 100- SCHENCK,U.,HERBERT,A.,SOLOMON, D., MMA,N.S.,COLLINS, R.J.,GUPTA,S.K., JIMENEZ AYALA, M., KOBILKOVÁ, J., NIELSEN, M., SUPRUN, H. Z. Terminology. International Academy of Cytology Task Force Summary. Acta Cytol.42(1) 5-15,1998.
- 101- SCHNADIG, V. J., DAVIE, K. D., SHAFER, S. K.,YANDELL, R. B.,HANNIGAN, E. V. The cytologist and bacteriosis of the vaginal-ectocervical area: clue, commas and confusion. Acta Cytolol. 33 (3):287-297,1989.
- 102- SCHNEIDER, V. The Bethesda System - the European perspective: report on the Second Conference on the Bethesda System for reporting cervical / vaginal Cytological diagnosis. Cytopathology 3 (1):27-29,1992.
- 103- SOBEL, J.D. Pathogenesis of Candida vulvovaginitis. (Review) Curr.Top.Med.Micro 3:86-108,1989.
- 104- SONNEX, C., LEFORT, W. Microscopic features of vaginal candidiasis and their relation to symptomatology. (Original article) Sex Transm. Inf. 75:417-419,1999.
- 105- SPIEGEL, C.A., AMSEL, R., ESCHENBACH,D., SCHOENKNECHT, F, HOLMES, K. K Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. N.Engl.J.Med.303 (11):601-607,1980.
- 106- SPIEGEL,C.A., AMSEL,R., HOLMES,K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J. Clin. Microbiol. 18 (1):170-177,1983.
- 107- SPIEGEL, C.A., ESCHENBACH, D. A., AMSEL, R.,HOLMES,K. K.Curved anaerobic bacteria in bacterial (nonspecific) vaginosis and their response to antimicrobial therapy J. Infect.Dis.148 (5):817-822,1983.
- 108- SPIEGEL, C. Bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Rev. 4 (4):485-502,1991.
- 109- STACK, P.S. Pap smears: still a reliable screening tool for cervical cancer. Postgrad.

- Med. 101(4):207-214,1997.
- 110- SWEET, R.L. The enigmatic cervix. *Dermatol. Clin.* 16 (4):739-745,1998.
- 111- SWEET, R.L. Gynecologic conditions and Bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 8 (3-4):184-190, 2000.
- 112-TAYLOR-ROBINSON, D., MC CORMACK, W.M. The genital mycoplasmas (First of two parts) *N. Engl. J. Med.* 302 (18):1003-1010,1980.
- 113-TAYLOR-ROBINSON, D., MC CORMACK, W. M. The genital mycoplasmas (Second of two parts) *N. Engl. J. Med.* 302 (19):1063-1067,1980.
- 114-TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Update on sexually transmitted mycoplasmas *Lancet* 351 (Suppl. III):12-15,1998.
- 115-TAYLOR-ROBINSON, D., RENTON, A. Diagnostic tests that are worthwhile for patients with sexually transmitted bacterial infections in industrialized countries. (Review) *Int. J. STD AIDS* 10:1-4,1999.
- 116-TEIXEIRA, C.V., MORAIS, M.G.F., NETO, J.R., SILVA, J.D., MORAIS, V.L.S.A. Fixação de padrões de flora do trato cérvico-vaginal. Contestação ao uso da classificação de Doderlein e modificações de Bozzini, 1993 e Linhares et al, 1995. *Rev. Bras. An. Clin.* 31 (2): 47-51,1999.
- 117-The Bethesda System for reporting cervical / vaginal cytologic diagnosis: revised after the second National Cancer Institute Workshop, April, 29-30, 1991. *Acta Cytol.* 37(2):115-124,1993.
- 118- Threat to medicine's most successful cancer screening test. *College of American Pathologists. Del. Med. J.* 69 (4):219,1997.
- 119- VILLAGRA, E., MARTINEZ, M. A., OVALLE, A. Flora microbiana genital en una poblacion de alto riesgo obstetrico. *Rev. Chil. Obstet. Gynecol.* 59 (1):32-38,1994.
- 120- VILOS, G.A. After office hours: the history of the Papanicolaou smear and the odyssey of George and Andromache Papanicolaou. *Obstet. Gynecol.* 91 (3): 479-483,1998.
- 121- VOIJJG, G. P. Opinion poll on quality assurance and quality control. Conducted by

- the Cometeetee on Continuing Education and Quality Assurance of the International Academy of Cytology. *Acta Cytol.* 40 (1):14-24, 1996.
- 122- WIED, G. L. The interpretation of inflammatory reactions in the vagina, cervix and endocervix by means of cytologic smears. *Am.J.Clin.Pathol.*28: 233-242,1957.
- 123- WITKIN, S.S. Immunological factors influencing susceptibility to recurrent candidal vaginitis. *Clin. Obstet. Gynecol.*34 (3): 662-668,1991.
- 124- WITKIN, S.S. Immunology of the vagina. *Clin. Obstet. Gynecol.* 36:122-128,1993.
- 125- WOORMLEY JR., F.L., CHAIRBAN, J., FIDEL JR., P. Cell adhesion molecule and lymphocyte activation marker expression during experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.* 69 (8):5072-5079,2001.
- 126-YOUNG, N.A., KLINE, T.S. Benign cellular changes: allied ambiguity in CLIA 88 and The Bethesda System. [Editorial] *Diagn. Cytopathol.* 10 (4):307-308, 1994.

10.0 SUMMARY

10.0 - SUMMARY

The effect of Papanicolaou cytological cervical-vaginal examination on the reduction of the incidence of squamous-cell carcinoma failed to clarify the importance of this examination, regarding the diagnosis of cervical vaginitis, calling into question the Bethesda System (TBS). The improvements in TBS in the area of squamous intra-epithelial lesions were not noted, where infections are concerned, despite advances in microbiological research.

The author did a study based on a sample of 10,064 cytopathological exams of which 86% presented inflammation, (12.34% minor inflammation 66.22% moderate inflammation and 7.44% severe inflammation). Clinical criteria were applied in 2,169 cases which required microbiological tests. The microbiological test was represented by the culture in 94.85% of the cases. It showed similar relative frequencies, among the three most commonly-found types of flora in both cytopathological and microbiological tests ($P < 0,0001$), i.e. *Lactobacillus sp.*, *Candida sp.* and *Gardnerella vaginalis*. The latter was diagnosed based on the occurrence of 'clue cells'.

It was confirmed that the Papanicolaou method could be used in the cytological diagnosis of *Lactobacillus sp.*, *Candida sp.*, *Leptotrix vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. Moreover, the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* based upon the identification of 'clue cells' is reliable. The diagnosis of *Actinomyces spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus sp.* is also possible, along with the probable presence of *Mobiluncus spp.* We can confirm that the codifying of the F1 and F11 floras is not applicable. As a consequence of this study, we propose the following modifications in the category of TBS infections, in relation to the specification of the microorganisms:

- 1) Retaining the *Lactobacillus sp.* Item.
- 2) Substituting 'Shift in the vaginal flora compatible with Vaginosis' for '*Gardnerella vaginalis* with the presence of 'clue cell'".

- 3) Including the topic concerning 'Alteration of flora to be clarified by way of a microbiological test'. The latter point would enable the cytopathologist to inform the clinic of the necessity of investigating suspected cases of infection which had been subjected to a cytological examination.



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

AUTOR: MARIA DO PERPETUO SOCORRO SILVA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Anatomia Patológica

NOME DA TESE: : Alcances e limites do exame citopatológico com a coloração de papacicolaou no diagnóstico das cérvico-vaginites.

ORIENTADOR: PROF^a MARIA DO CARMO CARVALHO DE ABREU E LIMA

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ANATOMIA PATOLÓGICA.

DATA: 04/06/2004

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof^a. Norma Thomé Jucá

Prof. Artur Lício Rocha Bezerra

citopapacolaou
diagnóstico de

Anatomia

Finalmente
Título.
UFPE