

CHLAMYDIA TRACHOMATIS EM ESFREGAÇOS CERVICAIS E VAGINAIS: IMPORTÂNCIA DO MÉTODO DE PAPANICOLAOU NO RASTREAMENTO EM GRANDES POPULAÇÕES*

Marina Yoshië Sakamoto MAEDA**
Maria José CAVALIERE**
Lai Wun Song SHIH**
Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO**

RIALA6/626

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. —
Chlamydia trachomatis em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolaou no rastreamento em grandes populações. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2): 45-50, 1987.

RESUMO: Foram selecionados, pelo método de Papanicolaou, esfregaços cervicais e vaginais sugestivos de infecção por *Chlamydia trachomatis*, para confirmação da infecção em colheita subsequente, por um método mais específico como a imunofluorescência, cuja aplicação não é prática em todos os casos, devido ao custo e tempo empregados. Foi utilizada uma amostragem de 40.000 esfregaços cervicais e vaginais que foram corados pelo método de Papanicolaou. Utilizando critérios morfológicos padronizados, foram detectados 97 (0,3%) casos sugestivos de infecção por *C. trachomatis*. Destes, selecionaram-se para repetição de colheita 41 pacientes. Duas lâminas foram preparadas: uma corada pelo método de Papanicolaou e outra submetida à reação de imunofluorescência direta. Dos 41 casos, 27 (66%) foram positivos pela imunofluorescência, sendo que destes 27 casos, 19 permaneceram sugestivos pelo método de Papanicolaou e 8, não. Os restantes 14 casos foram negativos pela imunofluorescência, sendo que 4 permaneceram sugestivos pelo método de Papanicolaou e 10, não. Concluiu-se que os critérios morfológicos identificáveis pelo método de Papanicolaou foram importantes no rastreamento de *C. trachomatis*, permitindo detectar casos que, submetidos à imunofluorescência, mostraram um bom índice (66%) de confirmação.

DESCRIPTORIOS: doenças do colo uterino; *Chlamydia trachomatis*; esfregaços vaginais; muco cervical, citopatologia.

INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis é um microrganismo intracelular obrigatório que infecta células colunares e metaplásicas da endocervix, causando cervicite mucopurulenta e podendo levar também a endometrite e salpingite. A infecção está frequentemente associada ao contato sexual com homens que apresentam uretrite não gonocócica inespecífica. *C. trachomatis* é também responsável pela conjuntivite de inclusão e pneumonite em recém-nascidos devido à transmissão do microrganismo na passagem pelo canal do parto (JAWETZ et alii⁶, TAYLOR-ROBINSON & THOMAS¹¹).

O ciclo de crescimento de *C. trachomatis* envolve uma fase extracelular, onde o microrganismo, metabolicamente inativo, recebe o nome de corpúsculo elementar. Este, atingindo a superfície da célula hospedeira, é englobado pela mesma por fagocitose, passando à fase intracelular infecciosa, com formação do corpúsculo reticular inicial dentro de um vacúolo. Os corpúsculos reticulares multiplicam-se por fissão binária dentro de um ou vários vacúolos na célula hospedeira. O estágio final é indicado pela presença, na célula hospedeira, de vacúolos perinucleares, com bordos distintos, amoldamento, justaposição e inclusões centrais em alvo (GUPTA et alii⁴). Posteriormente, estas células se rompem e libertam novos corpúsculos elementares.

* Realizado no Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

C. trachomatis tem sido apontada como um dos principais agentes responsáveis por infecção cervical em mulheres (BORGES et alii², GUPTA et alii⁴, RASSY⁸, TAYLOR-ROBINSON & THOMAS¹¹); daí o interesse em detectar sua presença em esfregaços cervico-vaginais de mulheres que procuram os Centros de Saúde para prevenção do câncer e tratamento de infecções ginecológicas.

Tem sido demonstrada a relação da infecção por *C. trachomatis* com metaplasia (BORGES et alii²) e com displasia e câncer cervical (HERE et alii³).

O presente trabalho apresenta um método de rastreamento do diagnóstico de *C. trachomatis* em grandes populações. O método consiste em duas etapas:

- a) Seleção de casos sugestivos de infecção por *C. trachomatis* na triagem geral de esfregaços cervico-vaginais corados pelo Papanicolaou, onde se evidenciam vacúolos de inclusão característicos.
- b) Solicitação de uma segunda amostra dos casos selecionados sem tratamento prévio das pacientes, para exame pela imunofluorescência e confirmação do diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento consistiu no estudo de uma amostra de 40.000 esfregaços cervico-vaginais recebidos pelo Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz para exame de prevenção de câncer. Utilizando critérios morfológicos padronizados, segundo GUPTA et alii⁴, para evidenciação de inclusões citoplasmáticas de *C. trachomatis* na coloração de Papanicolaou, foram encontrados 97 casos (0,3%) sugestivos. Destes, selecionaram-se para repetição da colheita, em lâminas duplas, fixadas em álcool-éter ou carbowax, 41 mulheres sem tratamento prévio, idade média de 45 anos, casadas, não gestantes, não fazendo uso de anticoncepcional.

Na segunda amostra, um esfregaço de cada caso foi corado pelo método de Papanicolaou, e analisado segundo critérios morfológicos nos aspectos de: presença de inclusões citoplasmáticas sugestivas de *C. trachomatis*, classificação do diagnóstico citológico, presença de substrato leucocitário, flora associada, presença de metaplasia. Outro esfregaço, após refixação em acetona por quinze minutos, foi submetido a teste de imunofluorescência direta utilizando o *Micro Trak* preparado pelos laboratórios Syva. Delimitou-se com lápis de diamante em cada lâmina uma área

circular de 6 mm de diâmetro contendo material suficiente, nem muito escasso, nem muito espesso. Adicionou-se, após re-hidratação das lâminas, à área delimitada cerca de 10 μ l da solução *Micro Trak* contendo o anticorpo marcado. As lâminas assim preparadas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C, a seguir lavadas em água destilada e montadas em lâminulas utilizando solução tamponada de glicerina. Os controles positivo e negativo utilizados foram os fornecidos pelo *Micro Trak*. Os preparados foram examinados em microscópio Zeiss epifluorescente no aumento de 500 vezes (objetiva de imersão). Os casos positivos mostraram a presença de corpúsculos elementares característicos com fluorescência verde-maçã, em forma de disco. Cada lâmina foi examinada por pelo menos duas pessoas diferentes, sendo considerada positiva aquela onde houve concordância de diagnóstico e cada campo continha pelo menos três corpúsculos elementares.

RESULTADOS

A figura 1 mostra o aspecto característico das inclusões citoplasmáticas tal como são vistas na coloração de Papanicolaou. A figura 2 mostra o aspecto dos corpúsculos elementares vistos ao microscópio de fluorescência em esfregaços submetidos ao teste de imunofluorescência direta.

A tabela da página 48 mostra a comparação dos resultados pelo exame de Papanicolaou e pela imunofluorescência. Dos 41 casos estudados, 27 foram positivos pela imunofluorescência e 14 negativos.

Casos positivos pela imunofluorescência: dos 27 casos positivos, 19 eram sugestivos pelo método de Papanicolaou na segunda amostra e 8 não, representando os últimos os falso-negativos.

Casos negativos pela imunofluorescência: dos 14 casos negativos, 4 eram sugestivos pelo método de Papanicolaou, representando os falso-positivos, e 10 não.

Considerando o método de Papanicolaou e a imunofluorescência, aquele mostrou sensibilidade de 83% e especificidade de 55%.

Os aspectos citológicos observados pelo método de Papanicolaou nos 27 casos sugestivos confirmados pela imunofluorescência foram: citologia normal, 1 (4%) e inflamatória 26 casos (96%); substrato polimorfonuclear presente em 23 casos (85%); metaplasia presente em 21 casos (78%); flora bacteriana dos tipos cocóide, 16 (60%), bacilar, 6 (22%) e mista, 2 casos (7%).

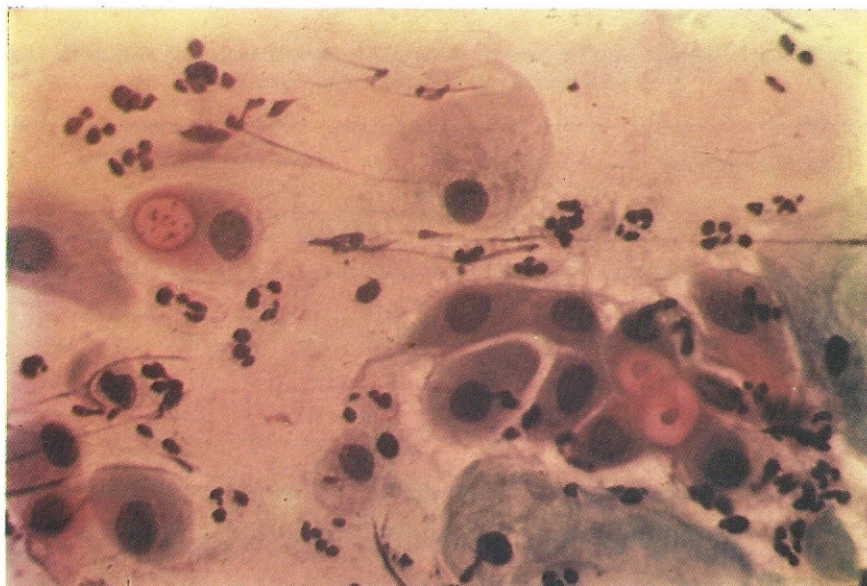


FIGURA 1 — Esfregaço cervical. Célula epitelial parabasal infectada por *Chlamydia trachomatis*. Coloração pelo método de Papanicolaou. 200 x, ampliada.

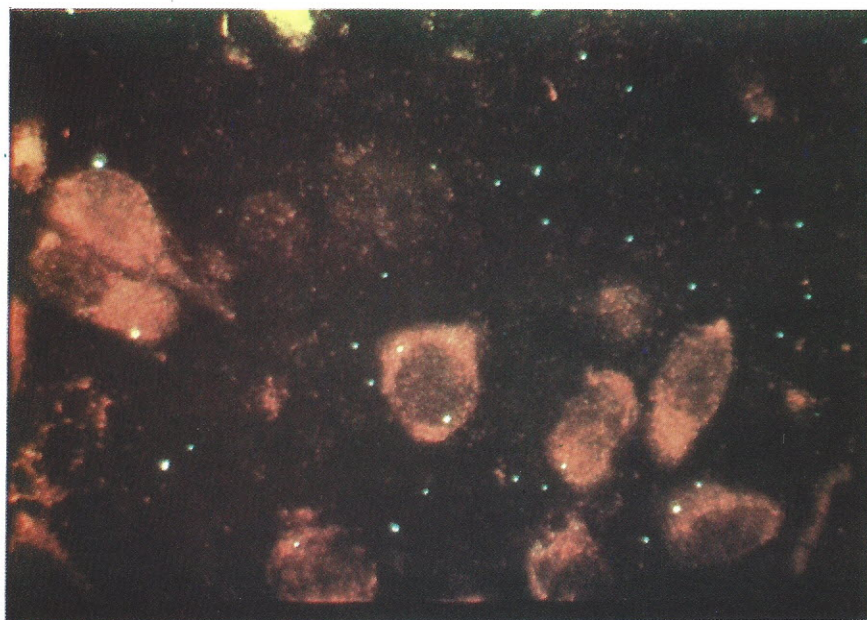


FIGURA 2 — Aspecto dos corpúsculos elementares extracelulares em esfregaços endocervicais submetidos ao teste de imunofluorescência direta (*Micro Trak*). 500 x, ampliada.

TABELA

Resultados obtidos na observação de 41 esfregaços cervicais e vaginais corados pelo método de Papanicolaou e submetidos à reação de imunofluorescência

Método de Papanicolaou	Casos positivos para <i>C. trachomatis</i>		Casos negativos para <i>C. trachomatis</i>		Total de casos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Casos sugestivos de <i>C. trachomatis</i>	19	46	4	10	23	56
Casos negativos para <i>C. trachomatis</i>	8	20	10	24	18	44
Total	27	66	14	34	41	100

DISCUSSÃO

Vários autores, como GUPTA et alii⁴ e TERHO¹², têm chamado a atenção para a presença de *C. trachomatis* como agente infeccioso de alta incidência, destacando suas manifestações clínicas e citopatológicas. A finalidade do presente trabalho foi demonstrar que o método de Papanicolaou é útil para o rastreamento deste agente em grandes populações com subsequente confirmação pela imunofluorescência direta nos casos sugestivos.

As pacientes por nós analisadas apresentavam em média 45 anos de idade, em contraste com os relatos de GUPTA et alii⁴ em que as pacientes eram mais jovens.

Os nossos achados citológicos são semelhantes aos relatados por BORGES et alii², com relação a exsudato inflamatório, tipos de células parasitadas (principalmente as metaplásicas) e aspectos das inclusões evidenciadas pelo método de Papanicolaou.

Um achado adicional de nosso trabalho foi a associação freqüente de *C. trachomatis* com flora cocóide.

Nosso critério de positividade pela imunofluorescência foi semelhante ao de BELDA et alii¹ e UYEDA et alii¹³, com relação à quantidade de corpúsculos elementares por campo.

O teste de imunofluorescência revelou 66% de positividade no total dos casos suspeitos na primeira colheita.

Quanto à utilidade do teste de imunofluorescência, vários autores (BRENDA et alii³, MUN-

DAY et alii⁷, SHAFER et alii⁹, STAM et alii¹⁰) têm citado sua alta especificidade e sensibilidade com relação à cultura, considerando-o como uma alternativa diagnóstica para detecção de *C. trachomatis* em casos suspeitos.

Os anticorpos monoclonais utilizados neste experimento são altamente específicos para proteína da membrana externa de *C. trachomatis*, embora resultados falso-negativos possam ser obtidos em amostras pouco preservadas, ou falso-positivos pela ligação inespecífica de imunoglobulinas à superfície de bactérias; neste caso, os corpúsculos elementares verdadeiros são distinguíveis pelo tamanho, que é de duas a três vezes menor que o das bactérias.

Quanto ao método de Papanicolaou, este mostrou ser um bom recurso para triagem de casos suspeitos, embora tenhamos encontrado casos falso-positivos, devido provavelmente à presença de vacúolos degenerativos semelhantes aos vacúolos de inclusão de *C. trachomatis*, ou de falso-negativos devido à ausência de células com estes vacúolos na amostra, embora esta possa conter corpúsculos elementares. A imunofluorescência consistiu portanto no método complementar, que permitiu a confirmação ou não da presença do microrganismo.

CONCLUSÃO

O método de Papanicolaou, próprio para detecção de câncer e lesões precursoras, permite além disso detectar agentes etiológicos, inclusive vacúolos com inclusões suspeitas de infecção por *C. trachomatis*, em seus diversos estágios. No entanto, este método não substitui aqueles mais sensíveis para detecção deste microrganismo, como a

imunofluorescência direta. Comparado a este método, o de Papanicolaou revelou uma sensibilidade de 83% e especificidade de 55%.

Concluimos que o método de Papanicolaou, simples e de baixo custo operacional, permite detectar casos suspeitos de *C. trachomatis*. Nestes, as pacientes seriam submetidas a uma segunda co-

lheita, para a realização de um teste mais específico, como a imunofluorescência.

Agradecimentos

À Divisão Diagnóstica do Laboratório Merck, São Paulo, pela execução do diapositivo da figura 2.

RIALA6/626

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. — *Chlamydia trachomatis* in smears of the cervix uteri and vagina. The importance of Papanicolaou staining in the screening of large population groups. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):45-50, 1987.

ABSTRACT: The Papanicolaou method was used for the selection of smears of the uterine cervix which could be employed for the use of a more specific method such as immunofluorescence which was more expensive and time-consuming than Papanicolaou's method. Using standardized morphologic criteria, 97 (0.3%) smears were selected from a total of 40,000 because they were suggestive of infection by *C. trachomatis*. The 97 smears served for the selection of 41 patients who would be called for further sampling. Two smears were made in each patient: one was stained by Papanicolaou method, the other was subjected to direct immunofluorescence. Of the 41 cases, 27 (66%) were positive by immunofluorescence while 19 were positive by Papanicolaou method and 8 were negative. The remaining 14 cases were negative by immunofluorescence while 10 were also negative by Papanicolaou method and 4 were suggestive of *C. trachomatis* infection. It is inferred that Papanicolaou method is important in the screening for *C. trachomatis* since 66% of the suggestive smears were confirmed by the more specific method (immunofluorescence).

DESCRIPTORS: cervix diseases; *Chlamydia trachomatis*; vaginal smears; cervix mucus, citopathology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELDA, W.; MENDES, C.M.F.; CARVALHO, R.P.S.; SIQUEIRA, L.F.G.; FRANCISCO, W. & SANTOS JR., M.F.Q. — *Chlamydia trachomatis*: estudo comparativo entre o isolamento em cultura de células e o exame direto, no diagnóstico de uretrite masculina. *Rev. paul. Med.*, 103:199-201, 1985.
2. BORGES, R.J.; CARMONA, O.; MACHADO, H. & SPARZA, J. — Chlamydial infection in Papanicolaou stained cervical smears. *Acta Cytol.*, 28:471-6, 1974.
3. BRENDA, T.; EVANS, R.T.; HAWKINS, D.A. & TAYLOR-ROBINSON, D. — Sensitivity of detecting *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in smears by use of a fluorescein labeled monoclonal antibody: comparison with conventional chlamydial isolation. *J. clin. Pathol.*, 37:812-6, 1984.
4. GUPTA, P.K.; LEE, E.F.; EROZAN, Y.S.; FROST, J.K.; GEDDES, S. & DONOVAN, P.A. — Cytologic investigations of Chlamydia infection. *Acta Cytol.* 23:315-20, 1979.
5. HARE, M.J.; TAYLOR-ROBINSON, D. & COOPER, P. — Evidence for an association between *Chlamydia trachomatis* and cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 89:489-92, 1982.
6. JAWETZ, E.; MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. — Clamídias. In: *Microbiologia Médica*, 13ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1980. p. 248-55.
7. MUNDAY, P.E.; JOHNSON, A.P.; THOMAS, B.J. & TAYLOR-ROBINSON, D. A comparison of sensitivity of immunofluorescence and Giemsa for staining *Chlamydia trachomatis* inclusions in cycloheximide-treated McCoy cells. *J. clin. Pathol.*, 33:177-9, 1980.
8. RASSY, J.C. — *Chlamydia trachomatis*: microbiologia, implicações clínicas e diagnósticas. *Folha Med.*, 87:163-7, 1983.
9. SHAFER, M.A.; VAUGHAN, E.; LIPKIN, E.S.; MOSCICKI, B.A. & SCHACHTER, J. — Evaluation of fluorescein-conjugated monoclonal antibody test to detect *Chlamydia trachomatis* endocervical infections in adolescent girls. *J. Pediatr.*, 5:779-83, 1986.

MAEDA, M.Y.S.; CAVALIERE, M.J.; SHIH, L.W.S. & YAMAMOTO, L.S.U. — *Chlamydia trachomatis* em esfregaços cervicais e vaginais: importância do método de Papanicolaou no rastreamento em grandes populações. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):45-50, 1987.

10. STAM, W.E.; HARRISON, R.H.; ALEXANDER, E.; CLES, L.D.; SPENCER, M., & QUINN, T.C. — Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by direct immunofluorescence staining of genital secretions. *Ann. intern. Med.*, 101:638-41, 1984.
11. TAYLOR-ROBINSON, D. & THOMAS, B.J. — The role of *Chlamydia trachomatis* in genital-tract and associated diseases. *J. clin. Pathol.*, 33:205-33, 1980.
12. TERHO, P. — *Chlamydia trachomatis* and clinical genital infections: a general review. *Infection*, 10(suppl.1):55-9, 1982.
13. UYEDA, C.T.; WELBORN, N.; ELLISON-BIRANG, N. SHUNK, K. & TSAOUSE, B. — Rapid diagnosis of Chlamydial infections with the Micro Trak direct test. *J. clin. Biol.*, 20:948-50, 1984.

Recebido para publicação em 11 de maio de 1987.