

**MICHELINE DE LUCENA OLIVEIRA**

**INFECÇÃO POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM PACIENTES  
COM E SEM LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS**

**Dissertação de Mestrado**

IMIP – 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MICHELINE DE LUCENA OLIVEIRA**

**INFECÇÃO POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM PACIENTES  
COM E SEM LESÕES INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação do Instituto Materno  
Infantil Professor Fernando Figueira como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Materno-  
Infantil

**ORIENTADORA: MELANIA MARIA RAMOS AMORIM**

**CO-ORIENTADOR: AURÉLIO ANTÔNIO RIBEIRO DA COSTA**

**IMIP – 2007**

## ***Dedico este trabalho...***

*... aos meus pais, Bartholomeu (in memoriam), que onde estiver com certeza estará orgulhoso e Dione, exemplos de trabalho e dedicação, sem o esforço de vocês teria sido impossível chegar até aqui.*

*Ao meu esposo Henrique, pelo estímulo constante e pela compreensão das horas de ausência do convívio familiar.*

*Aos meus filhos, Gabriela e Matheus, que este trabalho sirva de estímulo para suas vidas pessoais.*

*Aos meus irmãos, Cleriston, Eveline e Cleydson pelo carinho que sentem por mim e pelo exemplo de responsabilidade e dedicação ao paciente.*

## **AGRADECIMENTOS**

*... A Deus que me dá a força constante e a oportunidade diária de ajudar o próximo através da minha profissão. Obrigada por mais uma etapa na minha vida profissional!*

*...A minha família pelo apoio, carinho e compreensão das horas de ausência do convívio familiar. A vitória é nossa!*

*...A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Melânia e co-orientador Prof. Dr. Aurélio por sua dedicação, colaboração e ensinamentos transmitidos. Obrigada por tudo!*

*...Ao Prof. Dr. Petrus Augusto Dornelas Câmara, Prof. Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar e Prof<sup>ª</sup>. Dra. Leila Katz por terem composto a banca examinadora, engrandecendo esta dissertação. Obrigada por tudo!*

*...Ao Prof. Dr. Felipe Lorenzat, o pela valiosa colaboração neste estudo. Obrigada!*

*...Aos amigos do Ambulatório Especializado da Mulher (AMEM), do Laboratório de Saúde Pública da Prefeitura do Recife e do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami pela colaboração e participação ativa neste estudo. Obrigada!*

*...Aos amigos da 12<sup>a</sup> turma de mestrado do IMIP pelo companheirismo e incentivo nessa jornada de quase dois anos. Para sempre serão lembrados!*

*...A o Prof. Dr. Paulo Roberto de Souza, Dra. Lúcia Cristina, Dr. Lucas Brandão e Dr. Rafael Guimarães, pela ajuda indispensável na realização dos exames desta pesquisa.*

*...A Hilda, funcionária dedicada do Ambulatório Especializado da Mulher, pelo carinho com que sempre fui tratada. Sem você, não teria conseguido! Obrigada!*

*...A todos os amigos, residentes e funcionários do IMIP que contribuíram de alguma forma e torceram sinceramente pela realização deste estudo.*

*... A todas as pacientes que aceitaram participar da pesquisa. Obrigada!*

## Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ASCUS	Atipias escamosas de significado indeterminado
AGUS	Atipias glandulares de significado indeterminado
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CE	Corpúsculo elementar
CR	Corpúsculo reticular
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EIA	Enzimoimunoensaio
HPV	Papilomavírus Humano
HSP	Heat shock proteins
IMD	Imunofluorescência Direta
LCR	Ligase Chain Reaction
LIE	Lesão intra-epitelial cervical
OMS	Organização Mundial Saúde
PCR em tempo real	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RP	Razão de prevalência
TM	Temperatura de <i>Melting</i>

## RESUMO

**Objetivos:** determinar a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* (CT) em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais(LIE) atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher no Recife (2007), e sua associação com variáveis biológicas, demográficas, hábitos, características reprodutivas e clínico-ginecológicas, assim como comparar as taxas de detecção para *Chlamydia trachomatis* por duas técnicas, Imunofluorescência direta (IMD) e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR tempo real).

**Métodos:** realizou-se um estudo do tipo corte transversal, incluindo 70 mulheres (35 com alterações citológicas e 35 normais). Realizaram-se colposcopia, biópsia quando necessário e pesquisa para *Chlamydia trachomatis* por IMD e PCR tempo real. As variáveis analisadas foram idade, raça, procedência, escolaridade, estado civil, menarca, idade da primeira relação sexual, paridade, número de parceiros, corrimento, realização de citologia prévia, episódios de doença sexualmente transmissível (DST), eletrocauterização, método contraceptivo, antecedente familiar de câncer uterino, consumo alcoólico, tabagismo, drogas ilícitas e imunossupressoras, resultado da citologia e infecção cervical por *Chlamydia trachomatis*. Para determinação da força da associação, calculou-se a Razão de Prevalência (RP) e intervalo de confiança 95%, realizando-se análise multivariada para controle das variáveis potencialmente confundidoras. Determinou-se taxa de detecção para CT por cada teste de acordo com a presença ou não de LIE, utilizando-se os testes qui-quadrado de associação e Kappa, para concordância, ao nível de significância de 5%.

**Resultados:** a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi significativamente maior em pacientes com alterações citológicas (80% vs. 14,3%), com uma RP de 5,60 (IC 95% = 2,44 – 12,82). Analisando os fatores associados à infecção por CT, a única variável que persistiu significativamente associada após análise multivariada foi à história progressa de DST (OR=63,47; IC 95% = 13,93 – 289,09). A taxa de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi de 47,1% para IMD e 58,6% para PCR em tempo real. Observou-se associação significativa entre presença de *Chlamydia* e LIE, com 80% de resultado positivo para IMD e 77,1% PCR em

tempo real. Entretanto, a taxa de *Chlamydia trachomatis* foi significativamente elevada em pacientes sem lesão intra-epitelial cervical testadas por PCR tempo real (40%) quando comparado com IMD (14,3%). A concordância entre os testes foi fraca, com o coeficiente Kappa de 0,4.

**Conclusões:** a presença da *Chlamydia trachomatis* está associada às alterações citológicas da cérvix uterina, e a história pregressa de DST deve ser valorizada no tratamento e seguimento clínico destas pacientes. Os resultados da PCR em tempo real e IMD resultaram em elevadas taxas de infecção por *Chlamydia* em pacientes com lesão intra-epitelial cervical (80%), mas os testes foram discordantes quando pacientes sem lesão intra-epitelial cervical foram testadas, possivelmente porque a sensibilidade da PCR em tempo real ser grande.

**Palavras-chave:** *Chlamydia trachomatis*; técnica direta de fluorescência para anticorpo; Reação em cadeia da polimerase; neoplasia intra-epitelial cervical.

## Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	VI
Resumo.....	VII
I.Introdução.....	11
1.1. Microbiologia.....	15
1.2. Infecção e patogênese.....	16
1.3 Carcinogênese.....	17
II.Objetivos.....	21
III. Método.....	23
3.1. Desenho do estudo.....	23
3.2. Local do estudo.....	23
3.3. Período de estudo.....	24
3.4. População de estudo.....	24
3.5. Critérios e procedimentos para seleção dos participantes.....	24
3.6. Amostra ( procedimentos e cálculo do tamanho da amostra).....	25
3.6.1. tamanho da amostra.....	25
3.6.2. Procedimentos para seleção dos participantes.....	25
3.7. Procedimentos, testes, técnicas e exames.....	26
3.7.1. Procedimentos para coletas de dados .....	26
3.7.2. Procedimentos para coletas das amostras laboratoriais .....	27
3.7.3 Imunofluorescência direta(IMD).....	29
3.7.4. PCR em tempo real.....	30

	10
3.8. Processamento e análise dos dados .....	34
IV.Publicações.....	35
4.1. Artigo 1.....	35
4.2. Artigo 2.....	48
V.Conclusões.....	72
VI.Referências Bibliográficas.....	74
VII.Apêndices.....	78
7.1.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78
7.2.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para menores de 18 anos.....	81
7.3. Formulário para coleta de dados.....	85
7.4.Aprovação do Comitê de Ética.....	88

## I. INTRODUÇÃO

A infecção por *Chlamydia trachomatis* tem sido reconhecida como um dos mais comuns problemas de saúde pública.<sup>1,2,3</sup> Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as doenças sexualmente transmissíveis são a segunda enfermidade que mais acomete as mulheres entre 15 e 44 anos nos países em desenvolvimento.<sup>1,2</sup> Em relação à *Chlamydia trachomatis*, são 50 milhões de casos novos no mundo por ano<sup>3</sup>, e no Brasil não há muitos dados demonstrando a situação da infecção pela *Chlamydia trachomatis*. Estão disponíveis apenas estudos isolados em populações específicas, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio.<sup>2,4</sup>

A *Chlamydia trachomatis* foi primeiramente identificada em 1907 por Halberstaedter e Prowazek, mediante a identificação de inclusões citoplasmáticas em material proveniente da conjuntiva de orangotangos inoculados com tracoma humano.<sup>2,5</sup> Em 1911, essas inclusões citoplasmáticas foram associadas a uretrites não gonocócicas. Na década de 30, foram relacionadas ao linfogranuloma venéreo.<sup>5</sup> A partir da década de 1980, quando estabeleceu-se o papel desses agentes na etiologia da salpingite aguda (doença inflamatória pélvica aguda), houve notável incremento da importância atribuída a esses microorganismos, principalmente que desses estados infecciosos podem advir numerosas seqüelas.<sup>2,3,5</sup>

Na maioria das mulheres (70% a 75%) e em mais de 50% dos homens essas infecções cursam de forma assintomática<sup>1,3,6</sup>. Assim, esses agentes podem ser considerados microorganismos bem adaptados ao ser humano, porque conseguem multiplicar-se sem causar respostas exacerbadas do organismo, daí a dificuldade no diagnóstico dessas infecções.<sup>2,3,6</sup> Esta peculiaridade retarda o tratamento, permitindo que os casos de infecção genital se propaguem ao trato genital superior, causando endometrites e salpingites<sup>3,5,7</sup>. Hoje, a infecção pela *Chlamydia trachomatis* é

considerada como uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) mais freqüentes em todo o mundo<sup>1,2,3,8</sup>.

Em 2005, 976.445 casos de infecção genital por *Chlamydia trachomatis* foram relatados ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC) nos Estados Unidos, correspondendo a uma taxa de 332.5 casos por 100.000 habitantes. A prevalência em mulheres nos diversos estados variou entre 3,1% a 14,5% (mediana de 9,2%), sendo maior entre adolescentes, com mediana de positividade para *Chlamydia* de 14,2% (variando de 3,7% a 33,7%).<sup>8</sup> Os custos com saúde devido a complicações causadas por essa infecção são elevados.<sup>9</sup> Nos Estados Unidos foram estimados gastos de 2,7 bilhões de dólares americanos em 1990, para custo médico direto decorrente de doença inflamatória pélvica, com duas complicações freqüentes, a gravidez ectópica e infertilidade.<sup>9</sup>

Nos serviços públicos brasileiros, são raros os locais oferecendo sistematicamente a pesquisa da *Chlamydia*. Nos serviços privados, normalmente só se pesquisa essa infecção em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais está acometido. Mesmo nessas situações, a pesquisa da *Chlamydia trachomatis* ainda não faz parte da rotina da maioria dos ginecologistas, urologistas ou médicos que atendem DST, apesar da sua importância e sua possível relação com o câncer de colo uterino.<sup>2,4,10</sup>

A prevalência real da infecção por *Chlamydia trachomatis* em nosso meio é desconhecida, sendo necessários estudos populacionais para sua avaliação. A prevalência varia de acordo com a população estudada e o método diagnóstico adotado.<sup>2,4</sup> Teles et al.(2007) avaliaram 407 mulheres do Ambulatório de Planejamento Familiar, em Campinas e encontraram uma prevalência de 6,6%, tendo sido utilizado como método diagnóstico a técnica de imunofluorescência direta.<sup>11</sup>

No estudo de Frias et al(2001) <sup>6</sup>, realizado em Teresópolis, Rio de Janeiro, a frequência foi de 5% por *Chlamydia trachomatis* pelo método de Elisa, nas mulheres sexualmente ativas com idade entre 13 e 49 anos e no estudo de Santos et al(2003)<sup>12</sup>, realizado em Manaus, a prevalência foi de 20,7% para *Chlamydia trachomatis* pelo método da PCR.

No México, através de um estudo transversal multicêntrico, encontrou-se uma prevalência de *Chlamydia* através da pesquisa da IgG de 11,4% e IgA de 4,4%<sup>13</sup>; a infertilidade por dano tubário foi de 8,4% (IgG) e 1,4% (IgA) <sup>13</sup>, ao passo que outros estudos em Bogotá, Colômbia, observou-se uma prevalência de *Chlamydia* de 5%, pelo método da PCR.<sup>14</sup>

Existem diversas metodologias que podem ser utilizadas para a detecção da *Chlamydia trachomatis*. A escolha de um determinado método deve levar em consideração a prevalência da infecção na população que vai ser examinada, para que se defina uma metodologia com sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade compatíveis.<sup>5</sup> Além disso, é importante que se considere o custo-benefício do teste, as dificuldades para a sua execução, os equipamentos, infra-estrutura laboratorial e o tempo necessário para a liberação dos resultados.<sup>5</sup>

Os métodos mais amplamente utilizados são os de detecção do antígeno da *Chlamydia trachomatis* na amostra clínica. Método diagnóstico factível e com resultados aceitáveis, a imunofluorescência direta consiste na identificação dos corpúsculos elementares em material endocervical, através de anticorpos monoclonais fluorescentes, identificados através de microscópio ótico.<sup>5,6</sup> Esta técnica utiliza um ou mais anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes contra a principal proteína da membrana externa da *Chlamydia trachomatis*. A sua sensibilidade atinge 95% e a especificidade de até 100%.<sup>5,6</sup>

Independente do método adotado, a qualidade da amostra clínica coletada é fator determinante do sucesso do teste e taxas de detecção. A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória e, se a amostra colhida não contiver pelo menos 50 células epiteliais, poderão ocorrer resultados falso-negativos.<sup>5</sup>

Até esse momento a metodologia “padrão-ouro” para o diagnóstico da *Chlamydia trachomatis* é a cultura celular, entretanto a rápida evolução dos testes de amplificação do DNA (PCR e Ligase Chain Reaction- LCR, por exemplo), já suscita a reavaliação desse padrão na comunidade científica.<sup>5</sup> A cultura é um método diagnóstico muito preciso, entretanto seu custo extremamente elevado e a necessidade de utilização de técnicas sofisticadas, com meios de cultura em células vivas, tornam este método inviável na prática clínica.<sup>5,6</sup>

A PCR detecta com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas. São capazes de detectar até uma única partícula plasmídica de *Chlamydia trachomatis*.<sup>15,16</sup> A amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma sequência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica.<sup>15,16</sup> A sensibilidade destes testes de amplificação do DNA é em torno de 20% maior do que as demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio. Embora mais caros, aumentam a capacidade de diagnóstico desta infecção, com sensibilidade de 98,0 a 99,9%.<sup>15,16,17</sup>

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada PCR em tempo real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos.<sup>15,16,17</sup> A grande vantagem é a facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, bem como a velocidade de análise, pois se sobressaem em

relação aos demais métodos.<sup>15,16,17</sup> Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR que apresenta somente resultados qualitativos.<sup>15,16,17</sup> Pode ser executada completamente *in vitro* sem o uso de células<sup>15,16,17</sup> e realiza a quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.<sup>15,16,17</sup> Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena como traços mínimos de sangue e tecidos podendo conter restos de somente uma única célula.<sup>15,17</sup> O tempo gasto para entrega do exame é cerca de duas horas, ao passo que as demais técnicas necessitam de mais tempo para processamento do material.

## 1.1 Microbiologia

No início, as clamídias foram consideradas como grandes vírus ou *Rickettsia*, em razão de seu pequeno tamanho e do parasitismo intracelular obrigatório, no entanto é possível identificá-las por meio de microscopia óptica comum, ao serem encontrados corpúsculos de Gamma-Miyagawa.<sup>5</sup> A natureza bacteriana desses microorganismos é confirmada pela presença de membrana celular externa semelhante à de outras bactérias Gram-negativas, além do fato de apresentarem DNA, RNA e ribossomos.<sup>5</sup> Taxonomicamente pertencem à ordem *Chlamydiales*, à família *Chlamydiaceae* e ao gênero *Chlamydia*. O gênero *Chlamydia* possui quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* e *C. pecorum*. O homem só é hospedeiro natural para as espécies *C. trachomatis* e *C. pneumoniae*.<sup>5</sup>

A *Chlamydia trachomatis* possui 15 sorotipos diferentes, os quais são responsáveis por doenças diversas. Os sorotipos L1, L2 e L3 são responsáveis pela linfogranuloma venéreo; os sorotipos A, B, Ba e C pelo tracoma e; os D, E, F, G, H, I, J

e K pela conjuntivite de inclusão, uretrites, cervicites, salpingites e pneumonias do recém-nascido.<sup>5</sup>

## 1.2. Infecção e patogênese

A *Chlamydia trachomatis* apresenta uma transmissão predominantemente sexual e, no caso de contágio de recém-nascidos, vertical.<sup>2</sup> Atualmente, o mecanismo pelo qual esse patógeno induz a inflamação e o dano tecidual é apenas parcialmente conhecido. Sabe-se que a *Chlamydia* necessita do crescimento intracelular obrigatório, utilizando-se do aparato enzimático da célula do hospedeiro para a produção de ATP e a sua replicação invariavelmente determina a morte desta célula, sendo sempre considerada patogênica.<sup>2,5</sup>

As clamídias possuem um ciclo de desenvolvimento peculiar, o que as diferencia das demais bactérias. Este ciclo envolve a participação de duas formas de apresentação: os corpúsculos elementares (CE) e os corpúsculos reticulares (CR). O CE com 300 a 400 nm de diâmetro é a forma infectante e que resiste ao meio extracelular. O CE penetra na célula por fagocitose, formando um vacúolo citoplasmático também chamado corpúsculo de inclusão ou inclusão citoplasmática. Em seguida, o CE diferencia-se em CR, com diâmetro de 800 a 1000nm. O CR é a forma replicativa, metabolicamente ativa e não infectante da bactéria.<sup>5</sup> Os CR reproduzem-se por divisão binária e reorganizam-se em CE. Durante o processo de reprodução, ocorre um acúmulo de glicogênio na inclusão citoplasmática. Além disso, o processo de reprodução aumenta consideravelmente o tamanho da inclusão citoplasmática, que chega a conter mais de 10.000 partículas, ocupando até  $\frac{3}{4}$  do volume da célula hospedeira. Isso causa o

rompimento do vacúolo e da célula, a liberação das partículas e, conseqüentemente, o reinício do ciclo biológico, com a manutenção do processo infeccioso.<sup>5</sup>

Não há dúvidas de que a lise das células do hospedeiro participa do dano causado por esse agente infeccioso, no entanto é provável que esta ação direta seja de importância secundária e o dano principal ocorra mediante mecanismos imunológicos.

18

### **1.3. Carcinogênese**

A neoplasia cervical é o segundo tipo de câncer mais comum na população feminina. Estima-se que ocorram cerca de 230 mil mortes por câncer de colo uterino por ano no mundo, e cerca de 471 mil casos novos.<sup>19</sup> No Brasil ainda constitui um problema de grande magnitude, com uma incidência estimada de 20,3 por 100 000 mulheres para o ano de 2006, com variações importantes entre as regiões do país.<sup>19</sup> Em Pernambuco encontra-se uma incidência de 22,16 por 100.000 mulheres.<sup>19</sup> O principal fator associado com a ocorrência de câncer de colo uterino é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV).<sup>20,21</sup>

Para que uma neoplasia ocorra são necessários vários eventos. Os carcinógenos devem agir sobre um determinado substrato promovendo instabilidade gênica de seus componentes.<sup>20,21</sup> Essa instabilidade dá origem a mutações que serão detectadas pelo sistema de controle de qualidade e devidamente reparadas. Caso esse mecanismo venha a falhar, estará aberto o caminho para o desenvolvimento da neoplasia.<sup>20,21</sup>

Os agentes carcinógenos podem ser físicos, químicos, biológicos, ambientais ou hereditários. Porém, qualquer que seja a natureza, há necessidade de substrato alvo-

susceptível.<sup>20</sup> O agente etiológico nas neoplasias do trato genital inferior da mulher é, segundo evidências clínicas, biomoleculares e epidemiológicas, o papilomavírus humano (HPV) que irá agir no alvo susceptível: as células metaplásicas imaturas ou células basais do epitélio pavimentoso.<sup>20,21</sup> Entretanto, são necessários co-fatores de promoção complementares favorecedores da instalação do agente HPV, que são: idade da paciente<sup>22</sup>, início precoce das relações sexuais<sup>22</sup>, multiplicidade de parceiros<sup>22</sup>, primeira gestação na adolescência<sup>23</sup>, multiparidade<sup>21,22</sup>, antecedente de doenças sexualmente transmissíveis (DST)<sup>22</sup>, incluindo-se a *Chlamydia trachomatis*, uso de contraceptivos hormonais orais<sup>11</sup>, tabagismo,<sup>24</sup> déficit nutricional e imunológico (como pacientes HIV-positivas)<sup>18,25</sup>, além de fatores genéticos.<sup>25</sup>

A infecção persistente por *Chlamydia trachomatis* tem papel facilitador na carcinogênese cervical.<sup>18</sup> Há evidências de que pelo menos parte do dano é decorrente de reações de hipersensibilidade tardia.<sup>18</sup> Um provável antígeno relacionado à sensibilização é a proteína HSP60, pertencente a classe das proteínas de choque térmico (PCT) ou *heat shock proteins* (HSP).<sup>18,21</sup> Essas proteínas sintetizadas pelas *Chlamydia trachomatis* possuem grande semelhança com as PCT humanas, assim as proteínas clamídianas poderiam sensibilizar os linfócitos a responderem de forma cruzada com as PCT humanas,<sup>18,21</sup> e a expressão desses antígenos nas células dos tecidos do hospedeiro poderia induzir uma resposta imunológica contra as células expressoras, resultando na destruição dessas células. Percebe-se também que a concentração de anticorpos séricos contra PCT clamídianas guarda correlação com a intensidade do dano.<sup>18,21</sup> A proteína clamídiana HSP60 tem uma ação anti-apoptótica durante a infecção persistente, facilitando a atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas por HPV de alto risco (HPV tipo 16, 18 ).<sup>18</sup>

A carga crônica de vírus do tipo oncogênico, ao longo dos anos, parece ser um dos fatores de maior importância, no que se refere ao agente, em especial em pacientes jovens e com maior número de parceiros.<sup>20,21</sup>

A detecção precoce através do exame de Papanicolaou, proporcionou uma possibilidade de cura em praticamente a maioria dos casos.<sup>25</sup> No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a realização anual do exame de Papanicolaou (citologia oncológica) em mulheres de 25 a 60 anos ou nas sexualmente ativas e, após dois exames anuais consecutivos negativos, a cada três anos.<sup>25</sup>

Em um estudo comparativo realizado em La Plata, Argentina, Golijow et al.(2005)<sup>26</sup>, determinou-se a prevalência do papilomavírus (HPV) e da *Chlamydia trachomatis* em 279 mulheres pelo método da pesquisa de ácidos nucleicos (DNA), destas 79 com citologia oncológica normal e 200 com anormal.<sup>26</sup> Observou-se que a prevalência de *Chlamydia trachomatis* foi de 11% nas pacientes com citologia oncológica normal, ao passo que nas pacientes com citologia oncológica anormal com lesão de alto grau houve um incremento para 47%, ocorrendo em 20% nos casos de carcinoma escamoso. Por outro lado, a presença do HPV variou de 30% nas pacientes com citologia oncológica normal até 99-100% nas pacientes com citologia oncológica anormal. Desta forma, demonstrou-se uma forte associação com as lesões precursoras do câncer cervical de baixo e alto grau.<sup>26</sup>

Outro estudo realizado no Brasil e nas Filipinas mostrou que a *Chlamydia* foi um possível co-fator do HPV na etiologia do carcinoma cervical invasivo (OR: 2,1; IC 95%= 1,1–4,0), com resultados similares em ambos os países.<sup>23</sup>

Em Beirute (2002)<sup>21</sup> foi avaliada a relação causal entre o HPV e CT com citologias oncológicas normais e anormais em 121 mulheres e observou-se que a CT foi

significativamente mais freqüente nas pacientes com citologias oncóticas anormais com baixo e alto grau, maior paridade, maior número de parceiros e nas mulheres não fumantes.<sup>21</sup>

O contrário também foi observado relacionando-se com as lesões precursoras do colo uterino. No estudo de Edelman et al.(2000)<sup>27</sup>, não se observou impacto da prevalência de *Chlamydia* sobre as citologias oncóticas anormais; Reesink-Peters et al.(2001)<sup>28</sup> também não encontraram associação da infecção por *Chlamydia trachomatis* com a gravidade da lesão neoplásica e a velocidade de progressão da neoplasia cervical.

Neste contexto, insere-se nossa proposta de determinar a freqüência da infecção por *Chlamydia trachomatis* nas pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical em um serviço público da cidade do Recife e analisar as variáveis biológicas, demográficas, hábitos, características clínico-ginecológicas e reprodutivas associados à infecção por *Chlamydia trachomatis*, assim como comparar as taxas de detecção de infecção por *Chlamydia trachomatis* por duas técnicas (IMD e PCR em tempo real) nestas pacientes.

## II. OBJETIVOS

ARTIGO 1: “ Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais”

1) Determinar a freqüência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais atendidas em Ambulatório Especializado da

Mulher da Prefeitura Municipal do Recife (2007), utilizando-se o método da Imunofluorescência direta.

2) Descrever a associação da infecção por *Chlamydia trachomatis* com as variáveis biológicas (idade, raça), demográficas (procedência, escolaridade, estado civil), hábitos (consumo alcoólico, tabagismo, drogas ilícitas e imunossupressoras), características reprodutivas (menarca, idade da primeira relação sexual, paridade) e clínico-ginecológicas (número de parceiros, corrimento vaginal, realização de citologia prévia, episódios de DST, eletrocauterização, método contraceptivo, antecedente familiar de câncer uterino).

## II. OBJETIVOS

ARTIGO 2: “Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais avaliadas pela técnica de PCR em tempo real vs. IMF direta”

1) Comparar as taxas de detecção para *Chlamydia trachomatis* por duas técnicas, Imunofluorescência direta (IMF) e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR) em pacientes com e sem lesão intra-epitelial cervical, em Recife.

2) Avaliar a concordância dos resultados de PCR em tempo real e IMF-direta

### III. MÉTODO

#### 3.1. Desenho do estudo

Realizou-se um estudo transversal de base populacional para determinar a frequência da infecção por *Chlamydia Trachomatis* nas pacientes com e sem lesões precursoras do colo uterino.

#### 3.2. Local de estudo

O presente estudo foi realizado no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife. Este Ambulatório é referência na atenção à saúde da mulher e atende ao III Distrito- U.S.-129, abrange os bairros de Casa Amarela, Casa

Forte, Alto do Mandú, Apipucos, Derby, Dois Irmãos, Espinheiro, Graças, Jaqueira, Monteiro, Parnamirim, Poço da Panela, Santana, Tamarineira, Morro da Conceição, Alto José Bonifácio, Vasco da Gama, Mangabeira, Córrego do Euclides, Córrego do Bartolomeu, Alto José do Pinho, Pau Ferro, Passarinho, Brejo da Guabiraba, Sítio dos Macacos, Bola na Rede, Guabiraba, Macaxeira, Brejo de Beberibe, Córrego do Jenipapo e Nova Descoberta, com população total estimada de 308.063 habitantes (Fonte : IBGE – Censo 2005), e uma média de atendimento de 1.787 mulheres / mês no ano de 2005. (Fonte : III Distrito - Prefeitura do Recife).

### **3.3. Período do estudo**

Novembro de 2006 a abril de 2007.

### **3.4. População do estudo**

A população de estudo foi composta por 70 mulheres selecionadas através da demanda livre e espontânea, com citologia oncológica realizada nas redes credenciadas municipais e/ou estaduais, apresentando ou não lesões de baixo e alto grau/ASCUS/AGUS para câncer de colo uterino com validade de um ano e que não tivessem sido submetidas a tratamento prévio do colo uterino nos últimos seis meses.

### **3.5. Critérios e procedimentos para seleção dos participantes**

**Critérios de inclusão** – todas as mulheres que procurarem o Ambulatório Especializado da mulher da Prefeitura Municipal do Recife com citologia oncótica realizada nas redes credenciadas municipais e/ou estaduais, apresentando ou não lesões de baixo e alto grau/ASCUS/AGUS para câncer de colo uterino com validade de um ano e que não tenham sido submetidas a tratamento prévio do colo uterino nos últimos seis meses.

**Critérios de exclusão** – foram excluídas do estudo as mulheres HIV-positivas, e aquelas que não aceitaram realizar sorologia para HIV. Não tivemos nenhuma paciente em uso de drogas imunossupressoras.

### **3.6. Amostra ( procedimentos e cálculo do tamanho da amostra)**

#### **3.6.1. Tamanho da amostra**

O tamanho da amostra foi calculado no software EPI-INFO 3.3.2, utilizando-se o programa STATCALC, com base em dados de prevalência da literatura. Embora vários autores tenham relatado prevalências mais elevadas, optamos pelo estudo de Golijow et al.( 2005 )<sup>26</sup> realizado na Argentina, já que a população tem traços aparentemente semelhantes (país localizado na América do Sul), para avaliar a prevalência da *Chlamydia trachomatis* nas pacientes com citologias oncóticas normais e anormais. Neste estudo foram analisadas 279 mulheres, e observou-se que a prevalência por *Chlamydia trachomatis* foi de 11% nas pacientes com citologias oncóticas normais ao passo que nas pacientes com citologias oncóticas anormais com lesão de baixo e alto grau / ASCUS houve um incremento para 47%. Considerando-se infinito o tamanho da população, com uma precisão de 5,0 %, um nível de confiança de 95%, um poder de 80%, seria necessário um tamanho da amostra de 58 mulheres. Para compensar possíveis perdas, foi aumentado para 70 mulheres (aproximadamente 20%), sendo 35

com citologias oncóticas normais e 35 com citologias oncóticas anormais (lesões precursoras de baixo e/ou alto grau / ASCUS/AGUS).

### **3.6.2. Procedimentos para seleção dos participantes**

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira, em 05/10/2006, baseado na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e Comitê de Ética em Pesquisa.

Realizou-se uma marcação prévia e espontânea de livre demanda no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura municipal de Recife, utilizando-se dos critérios de inclusão e de exclusão. Antes de começar o ambulatório, foi realizado uma breve apresentação do que seria o estudo em termos leigos, onde todas as pacientes concordaram em participar. Posteriormente, foi feito a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, preenchimento do Formulário para Registro de Informações, assim como cadastramento em prontuários específicos para posterior tratamento e acompanhamento médico.

## **3.7. Procedimentos, testes, técnicas e exames**

### **3.7.1. Procedimentos para coletas de dados**

Durante o atendimento foram realizados preenchimento de prontuário, colposcopia, biópsias (se necessário) e cultura do conteúdo vaginal e endocervical com pesquisa para *Chlamydia trachomatis* por IMD e PCR em tempo real, solicitando-se o teste de HIV para as pacientes que não o tivessem realizado dentro do prazo de seis

meses. Após o atendimento, foi agendado o retorno para tratamento e acompanhamento de cada caso.

As variáveis de análise estudadas foram idade, raça, procedência, escolaridade, estado civil, menarca, idade da primeira relação sexual, paridade, números de parceiros, corrimento, realização prévia do exame de Papanicolaou, episódios de DST (conforme informação das pacientes), eletrocauterização, método contraceptivo, antecedente familiar de câncer uterino/ grau de parentesco, uso de medicação imunossupressora, consumo de álcool, tabagismo, consumo de drogas ilícitas, resultado da citologia e infecção cervical por *Chlamydia trachomatis*.

Consideramos como citologia normal às citologias com células escamosas superficiais, intermediárias e/ou endocervicais sem anormalidades; com metaplasia escamosa e/ou com alterações inflamatórias; e como citologias anormais as que apresentavam diagnóstico de lesão de baixo grau, lesão de alto grau, carcinoma escamoso, atipias de células escamosas de significado indeterminado e atipias glandulares de significado indeterminado.

### **3.7.2. Procedimentos para coletas das amostras laboratoriais**

A coleta da amostra consistiu em colocar um espécúlo (sem lubrificante) na vagina (das mulheres não menstruadas, sem utilizar duchas e cremes vaginais na véspera e três dias de abstinência sexual), retirar o excesso de muco cervical, e após inserir *swab* de algodão indicado no canal endocervical até ponta do *swab* não ser mais visível, rodar por alguns segundos, retirar evitando o contato com a parede vaginal e colocando-se em lâmina citológica devidamente identificada. Após secar completamente à temperatura ambiente, esta lâmina foi fixada com acetona, por

imersão, durante 10min. Após evaporação completa do fixador, as lâminas foram acondicionadas em recipientes próprios e encaminhadas ao Laboratório de Saúde Pública Municipal da Prefeitura do Recife para realização da Imunofluorescência direta, sendo processadas no máximo 24h após a coleta e a maioria delas nas primeiras horas após a coleta. Foram utilizados na análise da imunofluorencência direta os kits *Chlamydia* Direct IF, do Fabricante BioMérieux, rejeitando-se cinco amostras hemorrágicas e uma purulenta, e coletando-se posteriormente nova amostra da mesma paciente.

Infecção por *Chlamydia* foi considerada positivo pelo método da Imunofluorescência direta quando havia a presença de pelo menos cinco corpos clamidianos, ou se número menor, quando não havia dúvida de se tratar de *Chlamydia* (e não de artefato). Considerou-se negativa a ausência de corpos clamidianos, mas com presença de células epiteliais com formas geométricas mais ou menos alongadas, garantindo a qualidade da amostra.

Após este procedimento eram coletadas amostras de material da ectocérvice com espátula de Aires e da endocérvice com escova endocervical, rodando por alguns segundos e evitando-se, ao retirá-la, o contato com a parede vaginal. Este material era agitado em um sobrenadante contendo 15ml de SF 0,9% , e encaminhado para refrigeração e processamento no Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami para realização da PRC em tempo real. Os profissionais responsáveis pelas realizações dos métodos diagnósticos não tinham conhecimento das pacientes que tinham ou não lesão intra-epitelial cervical.

As amostras foram consideradas positivas pelo método da PCR em tempo real utilizando-se primers específicos para a seqüência do rDNA que amplifica a região do RNA ribossomal 16S da *Chlamydia trachomatis* presentes nas amostras clínicas.

A amostra clínica foi exposta por tratamento com detergentes ou por lise do microrganismo através de aquecimento e extraída para análise. O DNA extraído foi colocado em um tubo contendo todos os reativos necessários para a reação da PCR. Essa reação ocorre em um termociclador, onde inicialmente a dupla hélice é desnaturada, de modo que os *primers* possam se hibridizar nas seqüências complementares. A enzima taq polimerase promove a adição de bases, compondo uma nova molécula de DNA, que serve de molde para outros ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Múltiplos ciclos produzirão uma amplificação logarítmica de um segmento de DNA.<sup>15,16,29</sup>

Pacientes com IMD e/ou PCR em tempo real positiva para *Chlamydia* receberam azitromicina 1 grama por via oral, em dose única. As pacientes com citologia alterada foram acompanhadas de acordo com as normas do Ministério da Saúde.<sup>25</sup>

O estudo não houve patrocinador, e sim utilização da estrutura oferecida do Ambulatório Especializado da Mulher, Laboratório de Saúde Pública Municipal da Prefeitura do Recife e Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami.

### **3.7.3 Imunofluorescência direta(IMD)**

Independentemente do método de detecção direta em amostra clínica utilizado, a coleta adequada é essencial na Imunofluorescência direta e se relaciona diretamente com a sensibilidade e a especificidade do teste diagnóstico. Na prática, é um método

diagnóstico factível e com resultados aceitáveis. A sua sensibilidade atinge 95% e a especificidade é de 100%.<sup>5</sup>

A infecção por *Chlamydia trachomatis* pelo método da Imunofluorescência direta foi considerada presente quando anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína contra a proteína de membrana externa dos sorotipos de *Chlamydia trachomatis*, que possuem em comum esta proteína antigênica, são conjugados. Sendo assim, o anticorpo marcado (conjugado) liga-se especificamente a *Chlamydia trachomatis* presente no esfregaço endocervical ou uretral fixado com acetona. Os anticorpos não ligados são removidos com lavagem. Quando observados com microscópio de fluorescência, a *Chlamydia trachomatis* exibe uma fluorescência brilhante verde-maçã e pode ser detectada em todos os estágios de desenvolvimento: corpos elementares e corpos reticulares. Considerou-se positiva a presença de pelo menos cinco corpos clamidianos, ou se número menor, quando não havia dúvida de se tratar de *Chlamydia* (e não de artefato).<sup>5</sup> Considerou-se negativa a ausência de corpos clamidianos, mas com presença de células epiteliais com formas geométricas mais ou menos alongadas, garantindo a qualidade da amostra. Foram utilizados os kits *Chlamydia Direct IF*, do Fabricante BioMérieux, e rejeitadas as amostras hemorrágicas ou purulentas.

A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado e a dificuldade em se processar um grande número de amostras. A experiência na interpretação da Imunofluorescência direta é fundamental, porque a ligação inespecífica do anticorpo a outros microrganismos pode ocorrer, levando a um resultado falso-positivo.<sup>5</sup>

### 3.7.4. PCR em tempo real

A PCR em tempo real detecta com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas. São capazes de detectar até uma única partícula plasmídica de *Chlamydia trachomatis*.<sup>15,16</sup> A amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma seqüência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica.<sup>15,16</sup> A sensibilidade destes testes de amplificação do DNA é em torno de 20% maior do que as demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio. Embora mais caros, aumentam a capacidade de diagnóstico desta infecção, com sensibilidade de 98,0 a 99,9%.<sup>15,16,17</sup>

Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR que apresenta somente resultados qualitativos.<sup>15,16,17</sup> Esta técnica pode ser executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células e realiza a quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.<sup>15,16,17</sup> Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena como traços mínimos de sangue e tecidos que poderiam conter restos de somente uma única célula.<sup>15,16,17</sup>

A realização de PCR em tempo real foi feita usando um Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics, Australia), aparelho que possui quatro diodos emissores de luz permitindo a detecção de até quatro alvos em uma única reação de amplificação. A amplificação de DNA ou RNA consistiu na obtenção de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma seqüência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas .<sup>15,16,17</sup>

O processo da PCR pode ser dividido em três fases. Primeiro, o DNA de fita dupla (dsDNA) é desnaturado em temperatura acima de 90<sup>0</sup>C; Segundo, primers oligonucleotídeos anelam geralmente entre 50-60<sup>0</sup>C, e finalmente, a temperatura ótima de extensão do primer ocorre entre 70-78<sup>0</sup>C. A temperatura em que o primer anela é geralmente referida como temperatura de *Melting* (TM).<sup>15,16,17</sup>

As reações foram realizadas num volume final de 25 µl contendo SyberGreen Real Time Mastermix (Applied Biosystems), 1mM do Primer Forward (5'TCGAGAATCTTTTCGCAATGGAC) e 1mM do Primer Reverso (5'CGCCCTTTACGCCCAATAAA) e 2µl de DNA extraído.<sup>16</sup> O programa de ciclagem da PCR consistiu de uma fase inicial de aquecimento de 95°C por 10min e 40 repetições dos ciclos 95°C por 10s e 60°C por 65s.<sup>16</sup> As amostras utilizaram-se a seqüência do rDNA que amplifica a região do RNA ribossomal 16S da *Chlamydia trachomatis* presentes nas amostras clínicas e exposta por tratamento com detergentes ou por lise do microrganismo através de aquecimento e extraída para análise. O DNA extraído é colocado em um tubo contendo todos os reativos necessários para a reação da PCR, e colocado em um termociclador, onde inicialmente a dupla hélice é desnaturada, de modo que os *primers* possam se hibridizar nas seqüências complementares.<sup>15,16,17</sup>

A quantificação destes ácidos nucléicos é possível porque se reproduzem valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominada de *Cycle Threshold*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseada na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produtos da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. O composto fluorescentes que utilizamos foi o SYBR@Green .O SYBR Green é um corante que se

liga à alça menor do DNA dupla fita. Quando o corante SYBR Green liga a dupla fita de DNA, a intensidade da emissão fluorescente aumenta. Quanto mais amplicons de dupla fita forem produzidos, o sinal do corante irá aumentar.<sup>15,16,17</sup>

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador com sistema ótico para a excitação da fluorescência e coleção da emissão; e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação.<sup>15,16,17</sup>

A análise da curva de *Melting*, uma tecnologia revolucionária patenteada pela Roche Applied Science, baseia-se na adição de um corante ou sonda de oligonucleotídeo seqüência-específica, marcados com fluorescência durante as fases da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a PCR, uma “curva de *melting*” é gerada por um aquecimento lento e gradativo da dupla fita amplicom/corante (heteroduplex) medindo a mudança na fluorescência que resulta quando a sonda desnatura, ou “melts”, fora do amplicom. (Roche Applied Science). Cada DNA tem sua temperatura de *Melting* específica ( $T_M$ ), que é definida como a temperatura em que 50% de DNA torna-se fita simples. Estas temperaturas são determinadas pelo comprimento da fita dupla de DNA e o grau de complementaridade entre as fitas. Caso a fluorescência do corante seja monitorada continuamente através dos ciclos de temperatura, a desnaturação do produto pode ser observada como uma rápida perda de fluorescência próxima à temperatura de desnaturação.<sup>15,16,17</sup>

A peculiaridade da PCR em tempo real é que o processo da amplificação é monitorizado em tempo real usando técnicas de fluorescência, sem necessidade de uma manipulação pós-PCR.<sup>5,16,17</sup>

### 3.8. Processamento e análise dos dados

Os formulários foram revisados diariamente pela pesquisadora. Os dados incompletos ou incorretos foram confirmados, ou mesmo, repetidos.

Os dados foram armazenados, revisados e analisados no software Epi-Info versão 3.4.1, com dupla entrada. Para determinação da força da associação entre as diversas variáveis e a infecção por *Chlamydia trachomatis*, foi calculada a Razão de Prevalência (RP) e o seu intervalo de confiança a 95%, realizando-se análise multivariada para controle das variáveis potencialmente confundidoras. No modelo de regressão logística múltipla, entraram todas as variáveis independentes (preditoras) e a variável dependente (infecção por *Chlamydia trachomatis*), recodificadas binariamente como 1=sim e 0=não. As variáveis foram progressivamente retiradas do modelo adotando-se inicialmente o nível de significância de 10%, até que no modelo final persistiram apenas as variáveis associadas com a infecção por *Chlamydia trachomatis*, considerando-se o nível de significância de 5%.

Para avaliar a concordância entre a IMD e a PCR em tempo real, utilizou-se o teste kappa, em que 1 expressa a máxima concordância e 0 a ausência total de concordância. Para avaliar se existe diferença entre o percentual de positividade da IMD e da PCR em tempo real em todas as mulheres e de acordo com a presença ou não de lesões intra-epiteliais, utilizou-se o teste qui-quadrado de associação (*Pearson*). Em todas as etapas da análise, considerou-se o nível de significância de 5%.

#### 4. Publicações

4.1. ARTIGO 1: “ Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais”

Submetido a publicação na **Revista da Associação Médica Brasileira - RAMB**

De: sgp@ramb.org.br

Para: melamorim@uol.com.br

Data: Fri, 23 Nov 2007 08:38:32 -0200

Assunto: Artigo Submetido SGP/ RAMB

<[http://www.ramb.org.br/sgp/images/img\\_logo\\_branco.gif](http://www.ramb.org.br/sgp/images/img_logo_branco.gif)> Revista da Associação Médica Brasileira

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA

Rua São Carlos do Pinhal, 324 CEP: 01333-903 - Caixa Postal: 8904 - São Paulo SP - Brasil

Tel.: (11) 3178-6800 - Email: ramb@amb.org.br

São Paulo, sexta-feira, 23 de novembro de 2007

Ilmo(a) Sr.(a)

Prof(a), Dr(a) Melania Maria Ramos de Amorim

Referente ao código de fluxo: 82

Classificação: Artigos Originais

Informamos que recebemos o manuscrito Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Revista da Associação Médica Brasileira. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) Revista da Associação Médica Brasileira.

Atenciosamente, Bruno Caramelli

Editor

4.2. ARTIGO 2: “Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais avaliadas pela técnica de PCR em tempo real vs. IMF direta”

Submetido a publicação na **Brazilian Journal of Infectious Diseases**

Recife, 19 de novembro de 2007

ILMO. SR.

Dr. Anastácio Q. Sousa

Editor-chefe do Brazilian Journal of Infectious Diseases

Contexto Publishing

Rua Alfredo Magalhães, 04 – Barra - Salvador, Bahia, Brazil

40140-140,

Estamos encaminhando o manuscrito intitulado “Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais avaliadas pela técnica de PCR em tempo real x IMF direta”, para ser submetido à apreciação do Conselho Editorial de sua prestigiosa revista.

O conteúdo do trabalho representa as opiniões de todos os autores e nem o autor principal nem os co-autores submeteram manuscritos duplicados ou sobrepostos em outra publicação.

O autor principal é a Dra. Micheline de Lucena Oliveira, e o autor correspondente a Dra. Melania Amorim.

Atenciosamente,

---

Melania Maria Ramos de Amorim

Rua Neusa Borborema de Souza, 300. Bairro Santo Antônio. Campina Grande –  
PB

CEP 58103-313. e-mail: [melamorim@uol.com.br](mailto:melamorim@uol.com.br)

Fone: (83) 8822-1514 / (83) 3321-2695 Fax: (081) 3221-0681

May 22, 2008

Dear Dr. Melania Maria Ramos de Amorim

Thank you for submitting your manuscript "**Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais avaliadas pela técnica de PCR em tempo real vs.IMF direta**" publication in The Brazilian Journal of Infectious Diseases. The review process is underway, and the Editors will inform you of their decision as soon as possible. Your article has been assigned the manuscript number **002111 - 7**

Please refer to this number in all future correspondence.

Best regards



Andréia Lima

Submission Managing

Infecção por *Chlamydia* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais avaliadas pela técnica de PCR em tempo real vs.IMF direta

*Chlamydia infection in patients with and without cervical intra-epithelial lesions tested by real-time PCR vs. direct IMF*

**Autores:** Micheline de Lucena Oliveira

Melania Maria Ramos de Amorim

Paulo Roberto Eleutério de Souza

Lúcia Cristina Bezerra de Albuquerque

Lucas André Cavalcanti Brandão

Rafael Lima Guimarães

**Instituições:**

Instituto Materno-Infantil Prof. Fernando Figueira (IMIP)

Laboratório de Saúde Pública Municipal da Prefeitura do Recife.

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami (LIKA)

**Autor correspondente:** Melania Maria Ramos de Amorim

**Endereço para correspondência:**

Rua Neusa Borborema de Souza, 300

Bairro Santo Antônio

Campina Grande – PB

CEP 58103-313

e-mail: [melamorim@uol.com.br](mailto:melamorim@uol.com.br)

## RESUMO

**OBJETIVOS:** comparar as taxas de detecção para *Chlamydia trachomatis* por duas técnicas, Imunofluorescência direta (IMF) e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR) em pacientes com e sem lesão intra-epitelial cervical (LIE), em Recife.

**MÉTODOS:** realizou-se um estudo do tipo corte transversal, incluindo 35 mulheres com LIE e 35 sem LIE atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher, Recife, Brasil. Elas foram testadas para *Chlamydia trachomatis* usando duas técnicas, IMF direta e PCR em tempo real. Determinou-se a taxa de detecção para *Chlamydia trachomatis* por cada teste de acordo com a presença ou não de LIE, utilizando-se os testes qui-quadrado de associação e Kappa, para concordância, ao nível de significância de 5%.

**RESULTADOS:** a taxa de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi de 47,1% para IMF direta e 58,6% para PCR em tempo real. Observou-se associação significativa entre presença de *Chlamydia* e LIE, com 80% de resultado positivo para IMF direta e 77,1% para PCR em tempo real. Entretanto, a taxa de *Chlamydia trachomatis* foi significativamente elevada em pacientes sem lesão intra-epitelial cervical testadas por PCR tempo real (40%) quando comparado com IMF direta (14,3%). A concordância entre os testes foi fraca, com o coeficiente Kappa de 0,4.

**CONCLUSÃO:** os resultados da PCR em tempo real e IMF direta resultaram em elevadas taxas de infecção por *Chlamydia* em pacientes com lesão intra-epitelial cervical (80%), mas os testes foram discordantes quando pacientes sem lesão intra-epitelial cervical foram testadas, possivelmente porque a sensibilidade da PCR em tempo real é grande.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Chlamydia trachomatis*; imunofluorescência; Reação em cadeia da polimerase

**ABSTRACT**

**OBJECTIVES:** To compare detection rates of *Chlamydia trachomatis* by two techniques, direct immunofluorescence (IMF) and real time polymerase chain reaction (PCR) in patients with and without schamous intra-epithelial cervical lesions (SIL) in Recife.

**METHODS:** A transversal study was conducted involving 35 women with SIL and 35 without SIL attended at Ambulatório Especializado da Mulher, Recife, Brazil. They were tested for *Chlamydia trachomatis* using two techniques, direct IMF or real time PCR. The rates of *Chlamydia trachomatis* detection were compared and the association with intra-epithelial cervical lesions was determined using chi-square test at a 5% level of significance. Concordance between the tests was evaluated using kappa.

**RESULTS:** The global prevalence of *Chlamydial* infection was 47.1% by direct IMF and 58.6% by real time PCR. A significant association was observed between *Chlamydial* diagnosis and presence of intra-epithelial cervical lesions, with about 80% of positive results of direct IMF and 77.1% of real time PCR. Nonetheless, the rate of *Chlamydia trachomatis* was significantly greater in patients without intra-epithelial cervical lesions tested by real time PCR (40%) when compared to direct IMF (14.3%). The concordance between the tests was weak, with a kappa coefficient of 0.4.

**CONCLUSIONS:** Both real time PCR and direct IMF result in elevated rates of *Chlamydial* infection in patients with intra-epithelial cervical lesions (80%) but the tests are discordant when patients without cervical lesions are tested, possibly because sensitivity of real time PCR is greater.

**KEY-WORDS:** *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia* infections; fluorescent antibody technique, direct; polymerase chain reaction

## Introdução

A infecção por *Chlamydia trachomatis* tem sido reconhecida como um grande problema de saúde pública.<sup>1</sup> A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 50 milhões de casos de infecção por *Chlamydia trachomatis* ocorram a cada ano no mundo.<sup>2</sup> A *Chlamydia trachomatis* no trato genital pode causar doença inflamatória pélvica, linfogranuloma venéreo, uretrites não-gonocócicas, cervicites, salpingites, bartholinites, endometrites, infertilidade por fator tubário, e gravidez ectópica.<sup>2,3,4</sup> Os custos com saúde devido a complicações causadas por essa infecção são elevados. Nos Estados Unidos foram estimados gastos em torno de 2,7 bilhões de dólares americanos em 1990, para custo médico direto decorrente de doença inflamatória pélvica, com duas complicações frequentes, a gravidez ectópica e infertilidade.<sup>5</sup>

Cerca de 70- 75% das infecções em mulheres e mais de 50% em homens cursam de forma assintomática.<sup>2</sup> Assim, esses agentes podem ser considerados microorganismos bem adaptados ao ser humano, pois conseguem multiplicar-se sem causar respostas exacerbadas do organismo, daí a dificuldade no diagnóstico dessas infecções.<sup>6</sup> Esta peculiaridade retarda o tratamento, permitindo que os casos de infecção genital se propaguem ao trato genital superior, causando endometrites e salpingites.<sup>2,3,4</sup>

Em 2005, 976.445 casos de infecção genital por *Chlamydia trachomatis* foram relatados ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC) nos EUA, correspondendo a uma taxa de 332.5 casos por 100.000 habitantes. A prevalência em mulheres nos diversos estados variou entre 3,1% a 14,5% (mediana de 9,2%), sendo maior ainda em adolescentes, com mediana de positividade para *Chlamydia* de 14,2% (variando de 3,7% a 33,7%).<sup>7</sup> No Brasil, não estão disponíveis dados oficiais sobre a prevalência da infecção.<sup>8</sup>

Existem diversas metodologias que podem ser utilizadas para a detecção da *Chlamydia trachomatis*. A escolha de um determinado método deve levar em consideração a prevalência da infecção na população que vai ser examinada, para que se defina uma metodologia com sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade compatíveis.<sup>9</sup> Além disso, é importante que se considere o custo-benefício do teste, as dificuldades para a sua execução, os equipamentos, infra-estrutura laboratorial e o tempo necessário para a liberação dos resultados.<sup>9</sup>

Os métodos mais amplamente utilizados são os de detecção do antígeno da *Chlamydia trachomatis* na amostra clínica. É um método diagnóstico factível e com resultados aceitáveis, a imunofluorescência direta consiste na identificação dos corpúsculos elementares em material endocervical, através de anticorpos monoclonais fluorescentes, identificados através de microscópio ótico.<sup>9,10</sup> Esta técnica utiliza um ou mais anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes contra a principal proteína da membrana externa da *Chlamydia trachomatis*. A sua sensibilidade atinge 95% e a especificidade de até 100%.<sup>9,10</sup>

Até esse momento a metodologia “padrão-ouro” para o diagnóstico da *Chlamydia trachomatis* é a cultura celular, entretanto a rápida evolução dos testes de amplificação do DNA ( PCR e LCR, por exemplo), já suscitaram a reavaliação desse padrão na comunidade científica.<sup>9</sup> A cultura é um método diagnóstico muito preciso, entretanto seu custo extremamente elevado e a necessidade de utilização de técnicas sofisticadas, com meios de cultura em células vivas, tornam este método impraticável na prática clínica.<sup>9,10</sup>

A PCR detecta com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas. É capaz de detectar até uma única partícula plasmídica de *Chlamydia trachomatis*.<sup>11,12</sup> A amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma sequência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica.<sup>11,12,13</sup> A sensibilidade destes testes de amplificação do DNA é em torno de 20% maior do que as demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio. Embora mais caros, aumentam a capacidade de diagnóstico desta infecção, com sensibilidade de 98,0 a 99,9%.<sup>10,11,12</sup>

Ultimamente, uma inovação tecnológica resultante da PCR, denominada PCR em Tempo Real, vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. A grande vantagem é a facilidade na quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, bem como a velocidade de análise, pois se sobressaem em relação aos demais métodos.<sup>11,12</sup> Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR que apresenta somente resultados qualitativos.<sup>11,12,13</sup> Pode ser executada completamente *in vitro* sem o uso de células<sup>12,13</sup> e realiza a quantificação de fragmentos de DNA e RNA

de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.<sup>11,12,13</sup> Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena como traços mínimos de sangue e tecidos podendo conter restos de somente uma única célula.<sup>11,12</sup> O tempo gasto para entrega do exame é cerca de duas horas, ao passo que as demais técnicas necessitam de mais tempo para processamento do material.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de comparar as taxas de detecção de infecção por *Chlamydia trachomatis* por duas técnicas (IMF direta e PCR em tempo real) em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical em um serviço público da cidade do Recife.

## **Método**

Realizou-se um estudo transversal de base populacional para comparar as taxas de detecção de infecção por *Chlamydia trachomatis* de acordo com a técnica da imunofluorescência direta e PCR em tempo real em pacientes com e sem lesões precursoras do colo uterino, atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife, durante o período de novembro de 2006 a abril de 2007.

A população de estudo foi composta por 70 mulheres com citologia oncótica realizada nas redes credenciadas municipais e/ou estaduais, apresentando ou não lesões de baixo e alto grau/ ASCUS/AGUS para câncer de colo uterino com validade de um ano e que não tivessem sido submetidas a tratamento prévio do colo uterino nos últimos seis meses; foram excluídas do estudo as mulheres HIV-positivas (somente um caso detectado e substituído por outra paciente).

O tamanho da amostra foi calculado no software EPI-INFO 3.3.2, utilizando-se o programa STATCALC, com base em dados de prevalência da literatura. Embora vários autores tenham relatado prevalências mais elevadas, optamos pelo estudo de Golijow *et al.* (2005)<sup>14</sup> realizado na Argentina, já que a população tem traços aparentemente semelhantes (país localizado na América do Sul), para avaliar a prevalência da *Chlamydia trachomatis* nas pacientes com citologias oncóticas normais e anormais. Nesse estudo foram analisadas 279 mulheres, e observou-se que a

prevalência por *Chlamydia trachomatis* foi de 11% nas pacientes com citologias oncóticas normais ao passo que nas pacientes com citologias oncóticas anormais com lesão de baixo e alto grau / ASCUS houve um incremento para 47%, utilizando-se a técnica de amplificação do DNA, a PCR. Considerando-se infinito o tamanho da população, com uma precisão de 5,0 %, um nível de confiança de 95%, um poder de 80%, seria necessário um tamanho da amostra de 58 mulheres. Para compensar possíveis perdas, esse tamanho foi aumentado em aproximadamente 20% para 70 mulheres, sendo 35 com citologias oncóticas normais e 35 com citologias oncóticas anormais (lesões precursoras de baixo e/ou alto grau / ASCUS).

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP e todas as pacientes incluídas concordaram em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Durante o atendimento foram realizados preenchimento de prontuário, colposcopia, biópsias (se necessário) e cultura do conteúdo vaginal e endocervical com pesquisa para *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta e PCR em tempo real, solicitando-se o teste para HIV para as pacientes que não o tivessem realizado dentro do prazo de seis meses. Após o atendimento, foi agendado o retorno para tratamento e acompanhamento de cada caso.

As variáveis de análise estudadas foram idade, raça, procedência, escolaridade, estado civil, menarca, idade da primeira relação sexual, paridade, números de parceiros, corrimento, realização prévia do exame de Papanicolaou, episódios de DST (conforme informação das pacientes), eletrocauterização, método contraceptivo, consumo de álcool, tabagismo, resultado da citologia e infecção cervical por *Chlamydia trachomatis* pelos dois métodos (IMF direta e PCR em tempo real).

Consideramos como citologia normal às citologias com células escamosas superficiais, intermediárias e/ou endocervicais sem anormalidades; com metaplasia escamosa e/ou com alterações inflamatórias; e como citologias anormais as que apresentavam diagnóstico de lesão de baixo grau, lesão de alto grau, carcinoma escamoso, atipias de células escamosas de significado indeterminado e atipias glandulares de significado indeterminado.

Infecção por *Chlamydia trachomatis* pelo método da imunofluorescência direta foi considerada presente quando anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína contra a proteína de membrana externa dos sorotipos de *Chlamydia trachomatis*, que possuem em comum esta proteína antigênica, são conjugados. Sendo assim, o anticorpo marcado (conjugado) liga-se especificamente a *Chlamydia trachomatis* presente no esfregaço endocervical ou uretral fixado com acetona. Os anticorpos não ligados são removidos com lavagem. Quando observados com microscópio de fluorescência, a *Chlamydia trachomatis* exibe uma fluorescência brilhante verde-maçã e pode ser detectada em todos os estágios de desenvolvimento: corpos elementares e corpos reticulares. Considerou-se positiva a presença de pelo menos cinco corpos clamidianos, ou se número menor, quando não havia dúvida de se tratar de *Chlamydia* (e não de artefato). Considerou-se negativa a ausência de corpos clamidianos, mas com presença de células epiteliais com formas geométricas mais ou menos alongadas, garantindo a qualidade da amostra.

As amostras foram consideradas positivas pelo método da PCR em tempo real utilizando-se primers específicos para a seqüência do rDNA que amplifica a região do RNA ribossomal 16S da *Chlamydia trachomatis* presentes nas amostras clínicas.

A amostra clínica foi exposta por tratamento com detergentes ou por lise do microrganismo através de aquecimento e extraída para análise. O DNA extraído foi colocado em um tubo contendo todos os reativos necessários para a reação da PCR. Essa reação ocorre em um termociclador, onde inicialmente a dupla hélice é desnaturada, de modo que os *primers* possam se hibridizar nas seqüências complementares. A enzima taq polimerase promove a adição de bases, compondo uma nova molécula de DNA, que serve de molde para outros ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Múltiplos ciclos produzirão uma amplificação logarítmica de um segmento de DNA.<sup>11,12,13</sup>

A coleta da amostra consistiu em colocar um espécuro (sem lubrificante) na vagina (das mulheres não menstruadas, sem utilizar duchas e cremes vaginais na véspera e três dias de abstinência sexual), retirar o excesso de muco cervical, e após inserir *swab* de algodão indicado no canal endocervical até ponta do *swab* não ser mais visível, rodar por alguns segundos, retirar evitando o contato com a parede vaginal e colocando-se em lâmina citológica devidamente identificada. Após secar

completamente à temperatura ambiente, esta lâmina foi fixada com acetona, por imersão, durante 10min. Após evaporação completa do fixador, as lâminas foram acondicionadas em recipientes próprios e encaminhadas ao Laboratório de Saúde Pública Municipal da Prefeitura do Recife, sendo processadas no máximo 24h após a coleta e a maioria delas nas primeiras horas após a coleta. Foram utilizados na análise da imunofluorescência direta os kits *Chlamydia* Direct IF, do Fabricante BioMérieux, rejeitando-se cinco amostras hemorrágicas e uma purulenta, e coletando-se posteriormente novas amostras para essas pacientes.

Após este procedimento eram coletadas amostras de material da ectocérvice com espátula de Aires e da endocérvice com escova endocervical, rodando por alguns segundos e evitando-se, ao retirá-la, o contato com a parede vaginal. Este material era agitado em um sobrenadante contendo 15ml de SF 0,9% , e encaminhado para refrigeração e processamento no Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami. Os profissionais responsáveis pelas realizações dos métodos diagnósticos não tinham conhecimento das pacientes que tinham ou não lesão intra-epitelial cervical.

A realização de PCR em tempo real foi feita usando um Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics, Australia), aparelho que possui quatro diodos emissores de luz permitindo a detecção de até quatro alvos em uma única reação de amplificação. As reações foram realizadas num volume final de 25 µl contendo SyberGreen Real Time Mastermix (Applied Biosystems), 1mM do Primer Forward (5' TCGAGAATCTTTTCGCAATGGAC) e 1mM do Primer Reverso (5' CGCCCTTTACGCCAATAAA) e 2µl de DNA extraído.<sup>15</sup> O programa de ciclagem da PCR consistiu de uma fase inicial de aquecimento de 95°C por 10min e 40 repetições dos ciclos 95°C por 10s e 60°C por 65s.<sup>15</sup>

Pacientes com IMF-Direta e/ou para PCR Tempo Real positiva para *Chlamydia* receberam azitromicina 1 grama por via oral, em dose única. As pacientes com citologia alterada foram acompanhadas de acordo com as normas do Ministério da Saúde.<sup>16</sup>

Os dados foram armazenados, revisados e analisados no software Epi-Info versão 3.4.1, com dupla entrada. Para avaliar a concordância entre a IMF-*Chlamydia* e a PCR em tempo real, utilizou-se o teste kappa, em que 1 expressa a máxima concordância e 0 a ausência total de concordância. Para avaliar se existe diferença entre

o percentual de positividade da IMF-*Chlamydia* e da PCR em tempo real em todas as mulheres e de acordo com a presença ou não de lesões intra-epiteliais, utilizou-se o teste qui-quadrado de associação (*Pearson*). Em todas as etapas da análise, considerou-se o nível de significância de 5%.

## Resultados

Incluíram-se no estudo 35 pacientes com lesões intra-epiteliais e 35 sem lesões intra-epiteliais cervicais. Cerca de 23% tinham menos de 25 anos e 4,3% eram procedentes do interior de Pernambuco. Em torno de 56% tinham pelo menos oito anos de estudo e 48,6% tinham companheiros. Apenas 10% eram tabagistas e 34,3% referiam consumo de álcool. A idade na primeira relação foi menor ou igual a 14 anos em 20% das participantes. Em relação à paridade, 51,4% tinham tido dois ou mais partos. O número de parceiros foi menor que cinco em 81,4% dos casos. Cerca de 51% das pacientes referiam corrimento e 46% história pregressa de DST. Em torno de 33% estavam usando anticoncepcionais hormonais (Tabela 1).

A taxa global de infecção por *Chlamydia* foi de 47,1% quando se usou IMF direta e 58,6% quando se usou PCR em tempo real (Tabela 2). A frequência de infecção por *Chlamydia* por ambos os métodos foi significativamente maior em pacientes com lesões intra-epiteliais cervicais, 77,1% quando se usou IMF direta e 80% quando se usou PCR em tempo real (sem diferença estatisticamente significante). Entretanto, a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* foi significativamente maior em pacientes sem lesões intra-epiteliais cervicais quando se usou PCR em tempo real (40,0%) em relação a IMF-direta (14,3%) (Tabela 3).

Analisando-se a concordância entre ambos os testes, verificou-se uma fraca concordância, evidenciada por um coeficiente kappa de 0,4, com discrepância entre os resultados positivos e negativos de PCR em tempo real e IMF direta para *Chlamydia* (Tabela 4).

## Discussão

No presente estudo, observamos uma prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* de 47,1% e 58,6%, respectivamente, quando foram utilizadas as técnicas de IMF direta e PCR em tempo real. Essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando se comparou a taxa de positividade para *Chlamydia trachomatis* de acordo com a presença ou não de lesões intra-epiteliais, observou-se uma taxa de infecção por *Chlamydia trachomatis* semelhante entre pacientes com lesões intra-epiteliais (77,1% por PCR e 80,0% por PCR em tempo real), porém a taxa de infecção por *Chlamydia trachomatis* detectada por PCR em tempo real nas pacientes com citologia negativa foi quase três vezes superior (40,0%) do que a taxa detectada por IMF (14,3%), uma diferença que foi estatisticamente significativa. Avaliando a concordância, o kappa de 0,4 evidencia que existe fraca concordância entre ambos os testes.

No estudo de Michael et al<sup>17</sup> foram analisadas a sensibilidade e especificidade para *Chlamydia trachomatis* pelo método da PCR em mulheres assintomáticas, utilizando-se secreção cervical e urina. Foi observada uma sensibilidade de 92,8% e especificidade de 99,7% nas amostras cervicais e, na urina, a sensibilidade caiu para 85,5% e especificidade de 99,5%. Por sua vez, Shrier et al<sup>18</sup> avaliaram 126 pacientes por vários métodos como cultura, PCR e LCR, utilizando-se secreções uretral (cultura e PCR), vaginal (PCR), endocervical (cultura, PCR e LCR) e urina (PCR e LCR). Os autores observaram uma prevalência de *Chlamydia trachomatis* de 22%. As sensibilidades foram comparáveis para PCR e LCR (52% vs. 63%), porém variaram para PCR na urina (44%) e foram mais baixas para a cultura (22% a 37%); as especificidades variaram entre 99% e 100%, exceto para a LCR na urina (91%).

Em um estudo realizado em Taiwan, utilizando PCR, encontrou-se uma prevalência geral de 18,4% (95% IC – 17,3 – 19,5), com 16,7% em homens e 22,8% em mulheres (95% CI 17,5 – 28,1%). A prevalência em grupos específicos foi de 25,7% abaixo de 20 anos, 23,5% entre 20 e 24 anos; 22,3% entre 25 e 30 anos e 11,5% acima de 30 anos.<sup>19</sup>

No Irã, foram analisadas 123 amostras de secreções endocervicais de mulheres casadas, com idade entre 20 – 55 anos. A frequência para *Chlamydia trachomatis* foi de 17% (12%-25%), subdividida em vários grupos e utilizando-se a técnica de PCR – EIA.

Observou-se uma frequência de 49% no subgrupo com idade de 31-40 anos e de 33% no subgrupo com idade entre 20 – 30 anos.<sup>20</sup>

No estudo de Frias et al<sup>10</sup>, realizado em Teresópolis, Rio de Janeiro, a frequência foi de 5% por *Chlamydia trachomatis* pelo método de Elisa, nas mulheres sexualmente ativas com idade entre 13 e 49 anos e não usuárias de antibiótico oral ou vaginal nos 15 dias que antecederam ao exame, e no estudo de Santos et al<sup>21</sup>, realizado em Manaus, a prevalência foi de 20,7% para *Chlamydia trachomatis* pelo método da PCR.

Em São Paulo, um estudo realizado no Hospital das Clínicas, foram analisadas 189 amostras cervicais de mulheres sintomáticas e assintomáticas, com pesquisa para *Chlamydia trachomatis* pelo método da IMF direta com anticorpo monoclonal, cultura de células de McCoy e pesquisa de Anticorpo das classes IgG e IgA. A *Chlamydia trachomatis* foi identificada em 8,4% das mulheres com sintomas e em 13% daquelas sem sintomas.<sup>6</sup>

Um achado importante do nosso estudo foi a elevada frequência de *Chlamydia trachomatis* detectada tanto por PCR como por IMF-direta em pacientes com lesões intra-epiteliais cervicais, em torno de 80%, sugerindo que ambos os métodos são igualmente sensíveis para detectar a presença de *Chlamydia trachomatis* nestas pacientes. Todavia, essa elevada frequência, ao nosso ver, não justifica a pesquisa sistemática de *Chlamydia trachomatis* na presença de lesões intra-epiteliais cervicais, sugerindo, por outro lado, que uma estratégia eficaz em termos de relação custo-benefício seria o tratamento sistemático para *Chlamydia trachomatis* nestes casos.

Por outro lado, observam-se discrepâncias importantes na frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* detectada por PCR em tempo real e IMF-direta em nosso estudo, no subgrupo de pacientes com citologias negativas, ou seja, sem lesões, respectivamente 40% e 14,3%. Especulamos que essa diferença se deva à elevada sensibilidade da PCR para os diversos sorotipos da *Chlamydia trachomatis*, resultando em taxas de detecção mais elevadas em relação aos demais testes. Esses achados coincidem com os de diversos outros estudos evidenciando que a PCR em tempo real é mais sensível que a cultura para as cervicites e uretrites,<sup>10</sup> detectando com maior rapidez pequenas quantidades de ácidos nucléicos em amostras clínicas, independente da forma de apresentação.<sup>11,12</sup> É um teste capaz de detectar até uma única partícula

plasmídica de *Chlamydia trachomatis*, uma vez que consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma seqüência de DNA-alvo.<sup>11,12</sup>

A *Chlamydia trachomatis* possui 15 sorotipos diferentes, os quais são responsáveis por doenças diversas. Os sorotipos L1, L2 e L3 são responsáveis pela linfogranuloma venéreo; os sorotipos A, B, Ba e C pelo tracoma e; os D,E,F,G,H,I,J e K pela conjuntivite de inclusão, uretrites, cervicites, salpingites e pneumonias do recém-nascido.<sup>9,13</sup> O *primer* utilizado em nosso estudo é específico para a *Chlamydia trachomatis*, porém não permite a tipagem dos sorotipos. Houve quantificação da positividade para a *Chlamydia trachomatis*, porém ainda é necessário identificar os sorotipos específicos para determinar os sorotipos mais freqüentes em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais. Também é fundamental determinar a associação entre os diversos sorotipos e a presença de sintomas e lesões do trato reprodutivo (em especial obstrução tubária).

Estudos ulteriores são necessários para avaliar o impacto desse diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes sem alteração da citologia oncótica, com a finalidade de determinar se vale à pena utilizar PCR em tempo real de rotina na população geral ou de risco para infecção por *Chlamydia trachomatis*, ou se alternativamente seria mais interessante utilizar a IMF-direta. Analisar a presença de sintomas e as possíveis implicações da infecção por *Chlamydia* sobre o futuro reprodutivo é importante no sentido de elaborar uma estratégia de rastreamento. Embora o tratamento da infecção por *Chlamydia trachomatis* seja relativamente simples e de baixo custo, uma positividade de até 40% implicaria no tratamento de muitas mulheres, sem a comprovação de efeito benéfico em termos de prevenção de obstrução tubária e infertilidade.

### **Agradecimentos**

Ao Instituto Materno-Infantil Prof. Fernando Figueira (IMIP), ao Laboratório de Saúde Pública Municipal da Prefeitura do Recife, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo-Azami (LIKA) e ao Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura do Recife – AMEM, a quem expressamos o nosso reconhecimento.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization 2005. Sexually transmitted and other reproductive tract infections. Geneva, World Health Organization, 2005. Disponível em: [http://www.who.int/reproductive-health/publications/rtis\\_gep/rtis\\_gep.pdf](http://www.who.int/reproductive-health/publications/rtis_gep/rtis_gep.pdf) [2007 Nov 20]
2. World Health Organization. Department of HIV/AIDS. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva, World Health Organization, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/003.htm> [2007 Nov 20]
3. Machado ACS, Guimarães EMB, Sakurai E et al. High Titers of *Chlamydia trachomatis* Antibodies in Brazilian Women with Tubal Occlusion or Previous Ectopic Pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007; 2007: 24816. Published online 2007 May 17. doi: 10.1155/2007/24816.
4. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, et al. Lower Genital Tract Infection and Endometritis: Insight Into Subclinical Pelvic Inflammatory Disease. *Obstetrics & Gynecology* 2002; 100: 456-463.
5. Rein DM, Kassler WJ, Irwin KL, Rabiee L. Direct Medical Cost of Pelvic Inflammatory Disease and Its Sequelae: Decreasing, but Still Substantial. *Obstetrics & Gynecology* 2000; 95: 397-402.
6. Melles HHB, Colombo S, Linhares IM, Siqueira LFG. Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela *Chlamydia trachomatis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 355-361.
7. Center for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease Surveillance 2005 supplement. In: *Chlamydia prevalence monitoring project annual report* 2005. Atlanta, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/Chlamydia2005/CTSurvSuppComplete.pdf> [2007 Out 8]
8. Ministério da Saúde, Brasil, Programa Nacional de DST/aids. Diagnóstico laboratorial de clamídia, Brasília, 1997. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/cd05\\_09.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/cd05_09.pdf)
9. Frias MCAA, Pereira CFA, Pinheiro VMS et al. Frequência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* Netto e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. *J Bras Doenças Sex Transm* 2001; 13: 5-22.

10. Novais CM, Alves MP. PCR em tempo real. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 2004; 33: 10-13.
11. Houghton S G, Cockerill III F R. Real-time: Overview and applications. Surgery. 2006; 139: 1-5.
12. Xia Q-F, Xu S-X, Wang D-S, et al. Development of a novel quantitative real-time assay using duplex scorpion primer for detection of *Chlamydia trachomatis*. Experimental and Molecular Pathology 2007; 1-6.
13. Golijow CD, Abba MC, Mouron AS, et al. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. Gynecol Oncol 2005; 96: 181-6.
14. Goldschmidt P, Rostane H, Sow M et al. Detection by broad-range real-time PCR assay of *Chlamydia* species infecting human and animals. 2006; 90: 1425-1429.
15. Ministério da Saúde, Brasil. Caderno de Atenção Básica n 13. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. Brasília – DF, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abcad13.pdf> [ 2007 Nov 20]
16. Spigarelli MG, Biro FM. Sexually transmitted disease testing: Evaluation of diagnostic tests and methods. Adolescent Medicine Clinics 2004; 15:287- 299.
17. Shrier LA, Dean D, Klein E, et al. Limitations of screening tests for the detection of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic adolescent and young adult women. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2004; 190: 654-662.
18. Chen K-T, Chen S-C, Chiang C-C, et al. *Chlamydial* infection among patients attending STD and genitourinary clinics in Taiwan. BMC Public Health 2007; 7:120 doi:10.1186/1471-2458-7-120
19. Hashemi FB, Pourakbari B, Yazdi JZ. Frequency of *Chlamydia trachomatis* in Women with Cervicitis in Tehran, Iran. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 2007; 2007. ID 67014, doi 10.1155/2007/67014
20. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, by PCR. Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003; 7: 91-95.

Tabela 1. Características das pacientes submetidas a testagem para *Chlamydia* por PCR em tempo real e IMF-direta

Característica	N	%
<b>Idade</b>		
≤ 25 anos	16	22,9
> 25 anos	54	77,1
<b>Procedência</b>		
Rural	3	4,3
Urbana	67	95,7
<b>Escolaridade (anos)</b>		
≥ 8 anos	39	55,7
< 8 anos	31	44,3
<b>Situação marital</b>		

---

Com companheiro	34	48,6
Sem companheiro	36	51,4
<b>Consumo de fumo</b>		
Sim	7	10,0
Não	63	90,0
<b>Consumo de álcool</b>		
Sim	24	34,3
Não	46	65,7
<b>Idade da 1ª. relação sexual</b>		
≤ 14 anos	14	20,0
> 14 anos	56	80,0
<b>Paridade</b>		
< 2	34	48,6
≥ 2	36	51,4
<b>Nº. de parceiros sexuais</b>		
< 5	57	81,4
≥ 5	13	18,6
<b>Corrimento</b>		
Sim	36	51,4
Não	34	48,6
<b>Episódio de DST</b>		
Sim	32	45,7
Não	38	54,3
<b>Método contraceptivo</b>		
Hormonal	23	32,9
Não-hormonal	47	67,1

---

Tabela 2. Taxas de infecção por *Chlamydia* de acordo com a técnica utilizada.

Infecção por <i>Chlamydia</i>	IMF		PCR	
	n	%	n	%
Presente	33	47,1	41	58,6
Ausente	37	52,9	29	41,4
$\chi^2 = 2,33$	$p = 0,13$			

Tabela 3. Comparação dos resultados de PCR em tempo real com IMF-direta de acordo com os resultados da citologia oncológica

Citologia oncótica	PCR tempo real				IMF- <i>Chlamydia</i>				$X^2$	$p$
	Positiva		Negativa		Positiva		Negativa			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
Alterada	27	77,1	8	22,9	28	80,0	7	20,0	0,08	0,77
Normal	14	40,0	21	60,0	5	14,3	30	85,7	5,85	0,016
$X^2$	9,95				30,33					
$p$	0,002				0,00000000					

Tabela 4. Concordância entre IMF x PCR

---

IMF				
PCR	Positiva		Negativa	
	n	%	n	%
Positiva	27	65,9	14	34,1
Negativa	06	20,7	23	79,3

---

Kappa = 0,434

EP do Kappa = 0,116

Z= 3,73

p= 0,000096

## V.CONCLUSÕES

### ARTIGO 1

1. A presença da *Chlamydia trachomatis* está diretamente associada com as alterações intra-epiteliais cervicais (80% vs.14,3%). Sugerimos que todas as pacientes com diagnóstico dessas alterações recebam o tratamento preconizado para Chlamydia.
2. O fator de risco mais associado com a infecção por Chlamydia é história pregressa de DST, que deve ser valorizada no tratamento e seguimento clínico destas pacientes.

### ARTIGO 2

1. A elevada frequência de *Chlamydia trachomatis* detectada tanto por PCR em tempo real como por Imunofluorescência direta em pacientes com lesões intra-epiteliais cervicais (77,1% vs 80%), sugere que ambos os métodos são igualmente sensíveis para detectar a presença da *Chlamydia trachomatis* nestas pacientes.
2. A elevada frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* por IMD e PCR em tempo real, não justifica a pesquisa sistemática de *Chlamydia trachomatis* na presença de lesões intra-epiteliais cervicais, sugerindo que uma estratégia eficaz em termos de relação custo-benefício seria o tratamento sistemático para *Chlamydia trachomatis* nestes casos.
3. Os testes foram discordantes nas pacientes sem lesão intra-epitelial cervical (40% na PCR em tempo real e 14,3% na IMD). Especulamos que esta diferença deveu-se à elevada sensibilidade da PCR em tempo real para os diversos sorotipos da *Chlamydia trachomatis*.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization 2005. Sexually transmitted and other reproductive tract infections. Geneva, World Health Organization, 2005. Disponível: [http://www.who.int/reproductive-health/publications/rtis\\_gep/rtis\\_gep.pdf](http://www.who.int/reproductive-health/publications/rtis_gep/rtis_gep.pdf) [2007 Nov 20]
2. Ministério da Saúde, Brasil, SPC-CNDST/aids. Manual de Controle de DST, 3ª . ed., Brasília, 1999. Disponível em: [http://www.acemfc.org.br/modelo1/down/manual\\_controle\\_dst.pdf](http://www.acemfc.org.br/modelo1/down/manual_controle_dst.pdf) [2007 Nov 20]
3. World Health Organization. Department of HIV/AIDS. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Geneva, World Health Organization, 2001. Disponível: <http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/003.htm> [2007 Nov 20]
4. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Santos AB, Codes JGG, Silva Jr JC, Rizzo R. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2002; 24 : 101-106.
5. Ministério da Saúde, Brasil, Programa Nacional de DST/aids. Diagnóstico laboratorial de clamídia, 3ªed., Brasília, 1997. [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd05\\_09.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd05_09.pdf) [ 2007 Nov 20]
6. Frias MCAA, Pereira CFA, Pinheiro VMS, Pinheiro MS, Rocha CF. Frequência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* Netto e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. J bras Doenças Sex Transm 2001;13:5-22.
7. Melles HHB, Colombo S, Linhares IM, Siqueira LFG. Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela *Chlamydia trachomatis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33:355-361.
8. Center for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease Surveillance 2005 supplement. In: Chlamydia prevalence monitoring project annual report 2005. Atlanta. 2005. Disponível

em:<http://www.cdc.gov/std/Chlamydia2005/CTSurvSuppComplete.pdf> [2007 Out 8]

9. Rein DM, Kessler WJ, Irwin KL, Rabiee L. Direct Medical Cost of Pelvic Inflammatory Disease and Its Sequelae: Decreasing, but Still Substantial. *Obstetrics & Gynecology* 2000;95:397-402.
10. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Teixeira GG, Leal AS, Silva TJ, Oliveira MPR. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis e não clínicas na cidade de Salvador Bahia, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2006; 22 : 325-334.
11. Teles E, Hardy E, Oliveira UM, Elias CJ, Faúndes A. Reassessing Risk Assessment: Limits To Predicting Reproductive Tract Infection in New Contraceptive Users. *International Family Planning Perspectives* 1997; 23: 179-182.
12. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, by PCR. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.2003; 7:91-95.
13. Cravioto MDC, Matamoros O, Villalobos-Zapata Y, Pena O, García-Lara E, Martinez M, Castelo J, Sifuentes-Osornio J. Prevalencia de anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* y anti-*Neisseria gonorrhoeae* em grupos de indivíduos de la población mexicana. *Salud pública Méx.* 2003; 45:681 – 689.
14. Molano M, Weiderpass E, Posso H, Morre AS, Ronderos M, Franceschi S, Arslan A, Meijer CJLM, Muñoz N, Van Der Brule AJC. Prevalence and determinants of *Chlamydia trachomatis* infections in women from Bogota, Colombia. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 474-478.
15. Houghton S G, Cockerill III F R. Real-time: Overview and applications. *Surgery*. 2006; 139:1-5.

16. Xia Q-F, Xu S-X, Wang D-S, et al. Development of a novel quantitative real-time assay using duplex scorpion primer for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Experimental and Molecular Pathology*. 2007;1-6.
17. Novais CM, Alves MP. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2004; 33:10-13.
18. Di Felice V, David S, Cappello F, Farina F, Zummo G. Is chlamydial heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62: 4-9.
19. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer [homepage da Internet]. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro:2006 . Disponível em: [http:// www.inca.gov.br/estimativa/2006/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/) [2007 Nov 20 ]
20. Paavonem J. *Chlamydia trachomatis* and cancer. *Sexually Transmitted Infections* 2001;77:154-156.
21. Finan RR, Tamim H, Almawi WY. Identification of *Chlamydia trachomatis* DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. *Arch Gynecol obstet* 2002; 266:168-171.
22. Götz HM, Van Bergen JEAM, Veldhuijzen IK, Broer J, Hoebe CJPA, Richardus JH. A prediction rule for selective screening of *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect* 2005; 81:24-30.
23. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JMM, Peeling RW. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:324-331.
24. McIntyre-Seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human

- papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005; 14:1165-1170.
25. Ministério da Saúde, Brasil. Caderno de Atenção Básica n 13. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. Brasília – DF, 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abcad13.pdf> [ 2007 Nov 20]
26. Golijow CD, Abba MC, Mouron AS, Laguens RM, Dulout FN, Smith JS. *Chlamydia trachomatis* and Human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol. Oncol.* 2005; 96: 181-186.
27. Edelman M, Fox A, Alderman E, Neal W, Shapiro A, Silver EJ, Spigland I, Suhrland MJ. Cervical papanicolaou smear abnormalities and *Chlamydia trachomatis* in sexually active adolescent females. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 2000; 13: 65-69.
28. Reesink-Peters N, Ossewaarde JM, Van Der Zee AGJ, Burger MPM, Adriaanse AH. No association of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies and severity of cervical neoplasia. *Sexually Transmitted Infections* 2001; 77: 101-102.

## VII. APÊNDICES

### 7.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### I. Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome \_\_\_\_\_ do  
paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Documento de identidade: \_\_\_\_\_

## **II. Informações sobre a pesquisa**

***Título da pesquisa:*** “ Frequência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife”

***Pesquisadora:*** Dra. Micheline Oliveira Lobo Pereira da Costa

Cargo/função: Médica Ginecologista e Colposcopista do Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife, aluna do Mestrado Materno Infantil do IMIP

Inscrição conselho regional (CRM- PE): 11.405

Endereço: Rua Dr. José Maria, 866 / apto 1001 – Rosarinho – Recife -PE

Telefones: 3227-2332 / 9972-7008

Pesquisa a ser realizada Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife, sobre: “ Frequência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife”

Este estudo trata de descrever a frequência da infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer do colo uterino atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher (AMEM) da Prefeitura Municipal do Recife,

avaliando e comparando as características biológicas, demográficas, reprodutivas, clínico-ginecológica e hábitos da população analisada. Este estudo é importante devido a infecção persistente da *Chlamydia trachomatis* ter papel facilitador na formação do câncer do colo uterino.

O período da pesquisa será de novembro de 2006 a Abril de 2007.

### **III. Consentimento da participação do investigado**

Eu, \_\_\_\_\_, paciente matriculado no AMEM, registro \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informada pela pesquisadora Micheline Oliveira Lobo Pereira da Costa sobre a finalidade da pesquisa “ Frequência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife” e estou perfeitamente consciente de que:

1. Concordei em participar da pesquisa, sem que recebesse nenhuma pressão;
2. Tenho a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e metodologia, antes e durante o curso da pesquisa.
3. Estou ciente de que irei ser submetida a coleta de material endocervical para pesquisa de Infecção da *Chlamydia trachomatis*, colposcopia e biópsia de colo uterino (se necessário), ou seja, deixarei colocar um espécule vaginal (“bico-de-pato”) em minha vagina onde irá ser coletada secreção do meu colo do útero para investigação da bactéria *Chlamydia trachomatis*, bactéria esta que pode provocar infecções, infertilidade e está associada com o câncer de colo uterino. Após será realizado um exame com um aparelho que aumenta a imagem do meu colo do útero à procura de lesões, digo, manchas ou feridas. Caso eu apresente estas alterações me submeterei a uma biópsia de colo uterino, ou seja, retirarei pedacinhos pequenos do local alterado para análise e diagnóstico, procedimentos estes de incômodos leves a moderados e tenho o benefício de ser diagnosticado e tratado adequadamente.

4. Responderei perguntas do formulário acerca das minhas características biológicas, demográficas, reprodutivas, clínico-ginecológica e hábitos.
5. Continuarei sendo submetida aos atendimentos e tratamento rotineiros deste Ambulatório, independentemente de minha participação na pesquisa;
6. Tenho a liberdade de me recusar a participar do estudo e/ou a não responder a determinadas questões dos formulários e/ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo aos meus cuidados;
7. Tenho a garantia do sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
8. Estou ciente que, ao término da pesquisa, os resultados serão divulgados, porém sem que meu nome seja associado à pesquisa;
9. A pesquisadora se comprometeu a me comunicar qualquer resultado que implique a necessidade de uma intervenção médica, assim como respeitar o sigilo das informações coletadas.
10. Recebi da pesquisadora uma cópia deste documento

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Participante da Pesquisa

Pesquisadora

Apêndice 2
------------

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 18 ANOS**

**I. Dados de identificação dos sujeitos da pesquisa**

Nome \_\_\_\_\_ do  
paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Documento de identidade: \_\_\_\_\_

Nome dos pais ou responsável ( caso menor de 18 anos): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Documento de identidade: \_\_\_\_\_

## II. Informações sobre a pesquisa

**Título da pesquisa:** “ Freqüência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife”

**Pesquisadora:** Dra. Micheline Oliveira Lobo Pereira da Costa

Cargo/função: Médica Ginecologista e Colposcopista do Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife, aluna do Mestrado Materno Infantil do IMIP

Inscrição conselho regional (CRM- PE): 11.405

Endereço: Rua Dr. José Maria, 866 / apto 1001 – Rosarinho – Recife -PE

Telefones: 3227-2332 / 9972-7008

Pesquisa a ser realizada Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife, sobre: “ Freqüência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com

e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife”

Este estudo trata de descrever a freqüência da infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher (AMEM) da Prefeitura Municipal do Recife, avaliando e comparando as características biológicas, demográficas, reprodutivas, clínico-ginecológica e hábitos da população analisada. Este estudo é importante devido a infecção persistente da *Chlamydia trachomatis* ter papel facilitador na formação do câncer de colo útero..

O período da pesquisa será de novembro de 2006 a Abril de 2007.

### **III. Consentimento da participação do investigado**

Eu \_\_\_\_\_, responsável legal pela menor \_\_\_\_\_, paciente matriculado no AMEM, registro \_\_\_\_\_, declaro que fui devidamente informada pela pesquisadora Micheline Oliveira Lobo Pereira da Costa sobre a finalidade da pesquisa “ Freqüência de Infecção da *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife” e estou perfeitamente consciente de que:

11. Concordei juntamente com a menor, em participar da pesquisa, sem que recebesse nenhuma pressão;
12. Tenho a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e metodologia, antes e durante o curso da pesquisa.
13. Estou ciente de que irei ser submetida a coleta de material endocervical para pesquisa de Infecção da *Chlamydia trachomatis*, colposcopia e biópsia de colo uterino (se necessário), ou seja, deixarei colocar um espécuro vaginal (“bico-de-pato”) em minha vagina onde irá ser coletada secreção do meu colo do útero para investigação da bactéria *Chlamydia trachomatis*, bactéria esta que pode provocar infecções, infertilidade e está associada com o câncer de colo de utero. Após será realizado um exame com um aparelho que aumenta a imagem

do meu colo do útero à procura de lesões ,digo, manchas ou feridas. Caso eu apresente estas alterações irei me submeter a uma biópsia de colo uterino, ou seja, retirarei pedacinhos pequenos do local alterado para análise e diagnóstico, procedimentos estes de incômodos leves a moderados e tenho o benefício de ser diagnosticado e tratado adequadamente.

14. Responderei ou ajudarei a responder perguntas do formulário acerca das minhas características biológicas, demográficas, reprodutivas, clínico-ginecológica e hábitos.
15. Continuarei sendo submetida aos atendimentos e tratamento rotineiros deste Ambulatório, independentemente de minha participação na pesquisa;
16. Tenho a liberdade de me recusar a participar do estudo e/ou a não responder a determinadas questões dos formulários e/ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo aos meus cuidados;
17. Tenho a garantia do sigilo que assegure a minha privacidade e a da menor quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
18. Estou ciente que, ao término da pesquisa, os resultados serão divulgados, porém sem que meu nome ou a da menor seja associado à pesquisa;
19. A pesquisadora se comprometeu a me comunicar qualquer resultado que implique a necessidade de uma intervenção médica, assim como respeitar o sigilo das informações coletadas.
20. Recebi da pesquisadora uma cópia deste documento

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Participante da Pesquisa

---

Pesquisadora

---

Responsável da menor

## 7.2. Formulário para coleta de dados

**NOME DA PESQUISA:** Frequência de Infecção por *Chlamídia trachomatis* nas pacientes com e sem lesões precursoras do câncer de colo uterino atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife

**Formulário No**

**No de Registro**

---

**1ª Revisão em** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**2ª Revisão em** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

---

**1ª Digitação em** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

**2ª Digitação em** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

---

Nome: \_\_\_\_\_

End: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Cidade \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Cep \_\_\_\_\_

---

### Características biológicas e demográficas

Idade ( anos ) :

Procedência: Rural:  Urbana:

Cor: Negra/parda  Amarela  Branca  Outros

Escolaridade: Sem instrução  0 – 3  4-7  8-10  11 ou mais

Estado civil : Solteira  Casada/União estável  outras

### Características Reprodutivas

Menarca: < 12 anos  >= 12 anos

Início da primeira relação sexual : <14anos  14-20anos  > 20anos

Paridade : <2  2-4  >4

No de parceiros sexuais : < 5  >5

### Antecedentes clínico-ginecológico

Corrimento : sim  não

Realização prévia do exame de Papanicolaou : <2  >2  Quantos \_\_\_\_

Episódio de DST: sim  não  \_\_\_\_\_

Eletrocauterização : sim  não

Método contraceptivo : sem método  Barreira  Hormonal

Diu  Cirúrgico  \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares/ grau de parentesco: Sim – 1º Grau

Sim – 2º Grau

Não

Uso de drogas imunossupressoras : sim  não

### Hábitos

Consumo de fumo : sim  não

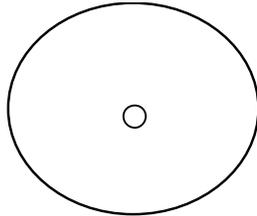
Consumo de álcool : sim  não

Consumo de drogas ilícitas : sim  não

### Dados do exame clínico e laboratoriais

Coloscopia: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Citologia oncótica \_/\_/\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Histopatológico \_/\_/\_

\_\_\_\_\_

--

**Infecção por Chlamydia trachomatis : sim  não**

---

#### **7.4. Parecer do Comitê de Ética**

Instituto Materno Infantil  
Prof. Fernando Figueira  
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil  
Instituição Civil Filantrópica



## DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto de pesquisa nº. 871, intitulado "**Freqüência de infecção da Chlamydia trachomatis em pacientes com e sem lesões precursoras do câncer cervical atendidas no Ambulatório Especializado da Mulher da Prefeitura Municipal do Recife**", apresentado pela Pesquisadora Micheline Oliveira Lobo Pereira da Costa, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP, em Reunião Ordinária 05 de outubro de 2006.

Recife, 09 de outubro de 2006.

  
**Dr. José Eulálio Cabral Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética  
e Pesquisa em Seres Humanos do  
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Dec. Lei 9851 de 08/11/67  
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Dec. Lei 5013 de 14/05/64  
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. Lei 84238 de 30/07/81  
INSCRIÇÃO MUNICIPAL 05.897.1  
INSCRIÇÃO ESTADUAL: Isento  
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista  
Recife - PE - Brasil CEP 50.070-550  
PABX: (81) 2122.4100  
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 355  
e-mail: imip@imip.org.br

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)