Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*

Diagnosis methods' forChlamydia trachomatis **genital infection**

JOÃO MICHELON*
ANDREY BOENO**
EDSON V. CUNHA FILHO***
GUSTAVO STEIBEL ***
CAROLINE BERG****
MARIA CAROLINA T. TORRENS****

RESUMO

Objetivos: Revisar os diferentes métodos para o diagnóstico de infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*.

Material e métodos: Revisão de literatura médica especializada.

Conclusões: Na escolha do método diagnóstico deve-se considerar a sensibilidade e especificidade da técnica pretendida, a individualidade do caso e a adequação aos recursos disponíveis. O exame cultural para *Chlamydia trachomatis* constitui-se no teste padrão, por apresentar a melhor especificidade na detecção da infecção. Entretanto, estudos recentes sugerem que as técnicas de amplificação de ácido nucléico têm demonstrado maior sensibilidade e especificidade semelhante ao teste cultural.

UNITERMOS: INFECÇÕES POR *Chlamydia; Chlamydia trachomatis;* SISTEMA UROGENITAL; TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO.

ABSTRACT

Objective: To review the different methods for the diagnosis of genital infection caused by **Chlamydia trachomatis**.

Material and methods: Review of medical literature.

Conclusions: By choosing the method, it must be consider the sensitivity and specificity of the technique, the individuality of the case and the available possibilities. The culture exam for Chlamydia trachomatis is the gold-standard test, due to its' best specificity in the detection of this disease. Nevertheless, recent trails suggests that the nucleic acid amplified tests have shown better sensibility and equal specificity when compared to the cultural test.

KEY WORDS: Chlamydia INFECTIONS; Chlamydia trachomatis; UROGENITAL SYSTEM; LABORATORY TECHNIQUES AND PROCEDURES.

^{*} Professor adjunto de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

^{**} Membro do Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

^{***} Médico Residente do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

^{****} Doutoranda do 6º ano da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

A Chlamydia trachomatis pertence à classe das Clamídias responsáveis por algumas infecções humanas; compromete sistemas como os olhos (tracoma e conjuntivite de inclusão do recém-nascido), o trato genital (linfogranuloma venéreo, uretrite não-gonocóccica e doença inflamatória pélvica) e o trato respiratório (pneumonite).

A *C. trachomatis* é uma das mais freqüentes doenças sexualmente transmissíveis (DST), causando aproximadamente 90 milhões de novos casos por ano no mundo, e está relacionada à esterilidade em número bastante significativo de mulheres^(1,2). Mais de 70% das mulheres com lesão tubária apresentam anticorpos circulantes para *Chlamydia trachomatis*⁽³⁾.

Entre os testes laboratoriais disponíveis para a detecção direta da *Chlamydia* está a cultura, a imunofluorescência direta (DFA), e indireta (IFI), o enzimoimunoensaio (EIA), a microimunofluorescência indireta (MIF) e as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, que apresentam maior sensibilidade.

Tendo em vista as complicações, comorbidades, dificuldades diagnósticas e custos originados através da infecção pela *Chlamydia trachomatis*, este estudo se propõe a relacionar e analisar os diferentes métodos para o diagnóstico de infecção urogenital por este microorganismo.

INFECÇÃO

A infecção por *Chlamydia trachomatis* pode ser adquirida através da relação sexual ou pelo contato da mucosa com outra área infectada. No trato genital feminino, tem afinidade pelas células do epitélio colunar, sendo a endocérvice o principal alvo⁽¹⁾.

Em cerca de 70% das mulheres, a infecção por *Chlamydia trachomatis* é assintomática. Sua associação com a gonorréia é muito freqüente podendo chegar a 40 a 60% das mulheres com a infecção^(1,2).

A prevalência geral de infecção é em torno de 15%, podendo variar de 8 a 40% de acordo com a população estudada. As taxas mais altas estão relacionadas a grupos de risco (adolescência, promiscuidade, antecedentes de DST, parceiro com uretrite não gononcócica, presença de ectopia cervical e/ou cervicite mucopurulenta). Macleod et al, em um estudo realizado na Ingla-

terra, identificou uma prevalência geral de *Chlamydia* entre as mulheres de 3,6%, sendo a mesma maior em jovens com menos de 25 anos (6,2%). Ele identificou como o mais forte determinante para a infecção a presença de um ou mais parceiros sexuais no passado⁽⁴⁾. Por sua vez, analisando as mulheres grávidas, Sheffield concluiu que a prevalência de infecção assintomática por *Chlamydia trachomatis* foi de 9%, com taxa de resolução espontânea de quase 50%⁽⁵⁾.

Na mulher, a infecção inicia-se usualmente pela endocérvice e ascende ao restante do trato genital. Pode causar cervicite, endometrite, salpingite ou doença inflamatória pélvica (DIP); como consequência, a infertilidade e a gravidez ectópica, são seqüelas comuns. A forma assintomática também pode ser causa de severo dano tubário.

Ao analisar a transmissibildade de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em prostitutas, Lyttle e Thompson concluíram que essas mulheres requerem regular *screening* para DST, mesmo com o uso regular do condon, o qual oferece proteção entre 30 e 90% contra doenças transmitidas no sêmen e secreções uretral, vaginal ou cervical, como HIV, gonorréia e *Clamydia*⁽⁶⁾.

O CDC (Center for Disease Control and Prevention) preconiza a triagem em todas as mulheres sexualmente ativas: com evidência de cervicite mucopurulenta e idade inferior a 20 anos, em mulheres com idade entre 20-30 anos que não utilizam métodos contraceptivos de barreira regularmente e/ou que tenham trocado de parceiro nos últimos 90 dias e em todas as mulheres com idade inferior a 30 anos atendidas em clínicas de planejamento familiar^(2,7). Pospisil destacou a importância de um regular screening para adolescentes sexualmente ativas e concluiu que o melhor método seria o Ligase Chain Reaction (LCR)⁽⁸⁾.

CICLO DE DESENVOLVIMENTO

Os sorotipos das Clamídias podem ser classificados de acordo com as diferentes apresentações clínicas: os sorotipos A, B, Ba, C estão associados ao tracoma endêmico; L1, L2, L3 ao linfogranuloma venéreo; D, E, F, G, H, I, J, K a infecções genitais e em neonatos^(1,2).

A Chlamydia trachomatis é um organismo gram-negativo; apresenta um ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos da célula hospedeira, originando inclusões citoplasmáticas características. Este ciclo é formado por duas fases distintas: uma elementar (forma infecciosa) e outra reticular (forma reprodutiva). A bactéria forma um corpo elementar (EB) que não pode se dividir, servindo apenas para propagar a infecção de uma célula para outra. Após incorporada à célula hospedeira, os corpos elementares se agrupam formando vacúolos que geram as formas reprodutíveis de *Chlamydia trachomatis* metabolicamente ativas, chamadas corpos reticulares (RB)^(1,2,9).

Desta forma, a *Chlamydia trachomatis* é um parasita intracelular obrigatório, reconhecida como verdadeira bactéria. Tem atividade metabólica bastante restrita e não é capaz de produzir sua própria energia, utilizando o ATP produzido pela célula hospedeira; por isso, é considerada parasita energético.

Os dois antígenos melhor relacionados ao diagnóstico e patogênese da infecção são o antígeno lipopolissacarídico (LPS), mais encontrado no RB, constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico e o antígeno major outer membrane protein (MOMP). Os antígenos da MOMP, por serem espécies e subespécies-específicos, são utilizados para sorotipagem⁽²⁾.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As principais alterações clínicas causadas pela *Chlamydia trachomatis* são: bartolinite; endocervicite (sítio mais acometido); síndrome uretral aguda (caracterizada por disúria, polaciúria e piúria em mulheres com urocultura negativa); doença inflamatória pélvica (a infertilidade é a sequela mais temida); infecções neonatais (mais comum nos partos vaginais) e síndrome de Fitz-Hugh-Curtis (processo inflamatório agudo peri-hepático). Como a *Chlamydia trachomatis* não se desenvolve no epitélio vaginal, não causa vaginite⁽¹⁾.

Em estudo recente envolvendo mulheres da Eslováquia, Simko observou que os mais frequentes diagnósticos associados à infecção por *Chlamydia* foram: anexite (38%), cervicite (22%), dor pélvica (9%), infertilidade (9%), parto prematuro (9%), abortamentos inexplicáveis (4%) e cistite e uretrite (3%)⁽¹⁰⁾.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

A sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico têm relação direta com a amostra

coletada. Para o exame cultural e pesquisa direta da *Chlamydia* emprega-se, tradicionalmente, o swab endocervical ou uretral. Para os testes de amplificação podem ser usadas amostras de urina. Nos testes indiretos, é recomendada especial atenção para a possibilidade de reações cruzadas interespécies. A Tabela 1 demonstra os principais métodos para o diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis*.

TABELA 1 – Metodologias laboratoriais para o diagnóstico direto e indireto da infecção por *Clamídia Tracomatis*⁽²⁾.

Cultura celular

- Pesquisa de antígenos Imunoflorescência direta (DFA) Enzimaimunoensaio (EIA)
- Pesquisa de ácidos nucléicos Sonda de DNA Amplificação (PCR, LCR, TMA)
- Pesquisa de anticorpos
 Imunodluorescência indireta (IFI)
 Microimunofluorescência indireta (MIF)
 Enzimaimunoensaio indireto (EIA)

Exame cultural

É considerado o teste padrão no diagnóstico. Geralmente utiliza-se *swab* endocervical ou uretral para sua coleta. O meio de crescimento mais utilizado para o cultivo é o de McCoy. A presença de inclusões citoplasmáticas de corpos elementares e reticulares, após o tecido ter sido corado com anticorpo monoclonal fluorescente, indica positividade do teste. Possui sensibilidade de 70-85% e especificidade de 100%. O custo elevado, a demora no resultado (48-72 horas após a inoculação) e os cuidados para manter os microorganismos viáveis são os aspectos desfavoráveis do método^(2,9,11,12).

Imunoflorescência direta

Consiste na identificação dos corpúsculos elementares com o uso de anticorpos monoclonais fluorescentes. Possui sensibilidade em torno de 85% e especificidade de 98%, quando comparado ao teste cultural. A coleta de material é feita por *swab* endocervical. As estruturas antigênicas são visualizadas através do uso de anticorpos monoclonais contra o LPS ou o MOMP; este último oferece menos resultados falsos positivos, por ser mais específico; já, o primeiro, favorece a rea-

ções cruzadas com outras bactérias ou subtipos de *Chlamydia*^(2,7). A técnica e interpretação dos resultados exigem treinamento técnico adequado, uma vez que, as ligações inespecíficas dos anticorpos levam a resultados falso-positivos^(2,9,12).

Enzimaimunoensaio (EIA)

Detecta o antígeno LPS ou MOMP através de anticorpos mono ou policlonais marcados com enzimas. O resultado final é visualizado por fotometria, fluorescência ou quimiofluorescência. Semelhante à imunofluorescência, quando utilizado anticorpos anti-LPS, o teste fica sujeito a reações cruzadas com o LPS de outros microorganismos, como algumas bactérias gram-negativas (Acinetobacter sp., Gardnerella, Neisserias, salmonelas e algumas enterobactérias), revelando resultados falsamente positivos. A sensibilidade gira em torno de 62-75% e a especificidade, próxima a 98% (2,7,9,12). Tem a vantagem de poder ser realizado em equipamento automatizado e de utilizar um anticorpo bloqueador, aumentando a especificidade do teste. Em estudo recente, Forward comparou o EIA com o Polymerase Chain Reaction (PCR) para a detecção de Chlamydia, observando um aumento de 46% na sensibilidade de identificação à favor do PCR. Além disso, o custo para cada PCR positivo foi de \$ 208.00 dólares contra \$ 226.00 dólares para o enzimaimunoensaio(13).

Pesquisa de anticorpos

Apesar da alta resposta imunológica às infecções por Chlamydia, a sorologia não é o melhor método para o seu diagnóstico. Não deve ser utilizado para screening, uma vez que, infecções prévias para Chlamydia trachomatis podem deixar níveis séricos de anticorpos elevados, tornando difícil a distinção temporal de um processo infeccioso; além disso, podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies de Clamídias. Podem ser usadas técnicas de imunoflorescência indireta, enzimaimunoensaio indireto e a microimunoflorescência indireta. Detectam anticorpos contra o antígeno LPS dos corpos elementares ou reticulares. Quando forem dosados separadamente anticorpos IgG, IgM e IgA, podemos considerar positivo para infecção recente se houver presença de IgA e/ou IgM e IgG com aumento significativo (ao menos dois títulos) entre uma amostra coletada na fase aguda e outra na convalescente. A microimunofluorescência é a mais sensível das técnicas e tem a vantagem de ser espécie e subespécie-específica, porém, é laboriosa e de alto custo^(9,11,12).

Pesquisa de ácidos nucléicos

A pesquisa de ácidos nucléicos é o exame mais promissor para o diagnóstico das infecções por *Chlamydia*. Pode ser feita através de sondas de DNA ou da amplificação de ácidos nucléicos.

Sondas de DNA com seqüência complementar ao RNA ribossomal 16S do genoma da *Chlamydia* e marcadas com éster de acridina, ao hibridizar com o DNA da *Chlamydia trachomatis*, são absorvidas por magnetismo, e a reação é quantificada com uso de luminômetro. Amostras hemolisadas são inadequadas devido ao efeito de autofluorescência, podendo produzir resultados falso-positivos.

Sua sensibilidade gira em torno de 75% e a especificidade entre 95-99%. É um teste que, a partir da década de 80, ganhou cada vez mais espaço, especialmente pelo fato de ser rápido na obtenção dos resultados (2-3horas) e necessitar pequena amostra de material^(2,9,11,12).

A Amplificação de Ácidos Nucléicos consiste na amplificação de seqüências de ácidos nucléicos específicos do microorganismo pesquisado, pela obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de primers (iniciadores) de uma següência de DNA-alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica. É capaz de detectar pequenas quantidades de ácidos nucléicos nas amostras utilizadas. Além do swab endocervical e uretral, possibilita a utilização de amostras de urina(14,15). Schachter sugere ainda a possibilidade de coleta de material com swab vaginal⁽¹⁶⁾. Os testes comerciais podem diferir na técnica empregada, sendo os principais a "Polymerase Chain Reaction" (PCR), a "Ligase Chain Reaction" (LCR) e a "Transcription-Mediated Amplification Assay" (TMA). As duas primeiras amplificam uma sequência de nucleotídeos do plasmídio, enquanto a última é dirigida à porção 23s do RNA ribossomal da Chlamydia. Quando os primers empregados são específicos para a Chlamydia trachomatis, a confiança no resultado do PCR, a técnica mais utilizada, aumenta significativamente(17).

Os testes de amplificação têm sensibilidade de 77 a 93%, ou seja, em torno de 20% maior do que a da cultura. Kellogg et al comparou os testes de amplificação de DNA e as técnicas de cul-

tura na detecção de *Chlamydia trachomatis* em crianças suspeitas de abuso sexual, identificando que, enquanto 11,1% das crianças suspeitas apresentaram teste posistivo para *Chlamydia* por LCR, apenas 0,8% tiveram exames culturais positivos⁽¹⁵⁾. Quando comparou os resultados entre PCR realizado a partir de secreção cervical e realizado a partir de amostra urinária, George et al. (18) identificou sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo de 100%, 98%, 96% e 100%, respectivamente, para amostra genital e 82%, 100%, 100% e 92%, respectivamente, para amostra urinária. A sensibilidade da PCR cervical é maior quando secreção endocervical mucopurulenta está presente (84%)⁽¹⁹⁾.

Em uma revisão relacionada à acurácia e à eficácia dos testes de *screening* para a detecção de *Chlamydia trachomatis*, Watson e colaboradores concluíram que os testes de amplificação do ácido nucléico usados em amostras não-invasivas, como urina, são mais efetivos para detectar infecção assintomática que testes convencionais⁽²⁰⁾.

As desvantagens destes testes relacionam-se aos custos elevados e à possibilidade de problemas relacionados à inibição. São mais dispendiosos que outros métodos não-culturais, mas, de menor custo que a cultura.

A Tabela 2 compara as principais características das diferentes técnicas de detecção direta de infecção por *Chlamydia*.

CONCLUSÃO

Na escolha do método diagnóstico deve-se considerar a sensibilidade e especificidade da técnica pretendida, a individualidade do caso e a adequação aos recursos disponíveis.

A cultura é o teste padrão para o diagnóstico das infecções urogenitais por *Chlamydia trachomatis*; tem a maior especificidade na comparação com as demais técnicas, porém apresenta custo elevado. As técnicas de PCR, embora, com alta sensibilidade, também apresentam custo elevado e disponibilidade restrita, mas estudos recentes têm demonstrado especificidade semelhante à da cultura. Os testes indiretos (pesquisa de anticorpos) apresentam reações cruzadas com freqüência, levando a um considerável número de exames falsamente positivos, além de condutas clínicas inadequadas.

Os diferentes métodos existentes tendem amiúde confundir o clínico, de maneira que gera embaraços na hora da escolha; assim, algumas vezes, é necessária a combinação de diferentes métodos para maior confiabilidade diagnóstica, outras vezes, dependendo da suspeita clínica, idade da paciente, desejo de gestação, recursos técnicos e financeiros, é aconselhável, independente da técnica a ser empregada, instituir o tratamento de imediato, especialmente se considerarmos o risco da seqüela feminina mais temida, a infertilidade.

TABELA 2 - Sumário comparativo das principais características de detecção direta⁽²⁾.

	Detecção de Antígeno			Detecção de ácidos nucléicos			
	Cultura	DFA	EIA	Sonda	PCR	LCR	TMA
Prevalência	70-85	75	62-71	75	90	87	ND
Especificidade	100	99,8	99,5	99,9	96-100	99-100	>99
Material Biológico	Qualquer	END,	END,	END,	END,	END,	END,
		URE,	URE,	URE,	URE,	URE,	URE,
		OC	OC,	OC	OC,	OC,	OC,
			URIm		URI	URI	URI
Viabilidade	S	N	N	N	N	N	N
Tempo de execução	48-72h	40min	2-3h	2-3h	2-3h	4-5h	4-5h
Teste confirmatório	N	N	S	S	N	N	N
Reação Cruzada	N	S	S	N	N	N	N
Equipamento	N	N	S	S	S	S	S
Contaminação	N	N	N	Inibição	Inibição	Inibição	Inibição

S = sim; N = não; ND = não-disponível; END = secreção endocervical; OC = secreção ocular; URE = secreção uretral; URI = urina; URIm = urina de pete do sexo masculino

BIBLIOGRAFIA

- Giraldo PC, Simões JA. Clamídia e micoplasmas. In: Halbe HW. Tratado de ginecologia. 3ª ed. São Paulo: Roca; 2000. p.1047-58.
- 2. Seadi CF, Oravec R, Poser BV, et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. J Bras Patol Med Lab. 2002;38:125-33.
- 3. Glina S. Infecção e infertilidade masculina. In: Badalotti M, Teloken C, Petraco A. Fertilidade e infertilidade humana. Rio de Janeiro: Medsi; 1997. p.475-83.
- 4. Macleod J, Salisbury C, Low N, et al. Coverage and uptake of systematic postal screening for genital *Chlamydia trachomatis* and prevalence of infection in the United Kingdom general population: cross sectional study. BMJ. 2005;330: 940.
- 5. Sheffield JS, Andrews WW. Spontaneous resolution of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* in pregnancy. Obstet Gynecol. 2005;105:557-62.
- 6. Lyttle PH, Thompson SC. Maintaining sexual health in commercial sex workers in Australia: condom effectiveness, screening and management after acquiring sexually transmissible infections. Aust N Z J Public Health. 2004;28:351-9.
- 7. Center for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. MMWR. 2002;51(RR-6):30-52.
- 8. Pospisil L, Stroblova H, Pejcoch M. Importance of regular screening for genital chlamydiosis in adolescents [abstract]. Ceska Gynekol. 2003;68:68-71.
- Hamdad F, Orfila J, Boulanger JC, et al. *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in women. Best diagnosis approaches. Gynecol Obstet Fertil. 2004; 32:1064-74.
- 10. Simko J, Holly I, Hudecova M. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using PCR in gynecology patients in Slovakia [absctract]. Ceska Gynecol. 2002;67:376-9.
- 11. Jackson B. Relative cost-effectiveness of different tests for *Chlamydia trachomatis*. Ann Intern Med. 2005;142: 308-9.

- 12. Black MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin Microbiol Rev 1997;10:160-84.
- 13. Forward KR. The impact of switching to polymerase chain reaction for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. Can J Public Health. 2003;94:229-32.
- Gaydos CA, Quinn TC. Urine nucleid acid amplification tests for the diagnosis of sexually transmitted infections in clinical practice. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:55-66.
- Kellogg ND, Baillargeon J, Lukefahr JL. Comparison of nucleid acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia* trachomatis in victims of suspected child sexual abuse. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2004; 17:331-9.
- Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol. 2003;41:3784-9.
- 17. Martin DH, Nsuami M, Schachter J, et al. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient "gold standard" in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. J Clin Microbiol. 2004;42:4749-58.
- 18. George JA, Panchatcharam TS, Paramasivam R. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. Jnp J Infect Dis. 2003;56:88-92.
- Marazzo JM, Johnson RE, Green TA. Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification tests and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections. J Clin Microbiol. 2005;43:577-84.
- Watson EJ, Templeton A, Russel I. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. J Med Microbiol. 2002;51:1021-31.

Endereço para correspondência: JOÃO MICHELON

JOÁO MICHELON Faculdade de Medicina da PUCRS ??? Av. Ipiranga, 6690 CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: ??? E-mail: ???