

PREMIO NIVEL C

**HOSPITALES I, CLINICAS, POSTAS Y CENTROS
ASISTENCIALES**

***Diagnóstico citológico de Clamidia en
secreción cérvico-vaginal, utilizando una
modificación del Papanicolaou con solución
bufferizada de Wright***

Autores:

Dr. César T. Vela Velásquez

Biol. Nilo Mendoza Rojas

T.M. Liliana C. Otiniano Pumarica

Clínica Francisco Pizarro-Rimac. Lima

RESUMEN

Realizamos un trabajo prospectivo en 1,569 pacientes de la Clínica "Francisco Pizarro" - IPSS, para evaluar la utilidad diagnóstica de la observación empírica en nuestro laboratorio: adicionando a la coloración del Papanicolaou una solución de Wright bufferizada se visualizaban inclusiones citoplasmáticas en citologías cérvico-vaginales, sugestivas de infección clamidiásica con el Papanicolaou.

Tuvimos 2 grupos de pacientes, el criterio de selección para el grupo A fue la presencia de células multivacuoladas y para el B la presencia de gránulos (sin ser incluidos en una vacuola) en el citoplasma de células epiteliales intermedias bajas o células parabasales.

Se obtuvieron 7 pacientes en el grupo A y 16 en el B.

Obtuvimos 2 láminas gemelas de secreción cérvico-vaginal de cada paciente antes y después del tratamiento, una coloreada con el Papanicolaou y la otra con nuestra variante. La prueba terapéutica fue hecha con doxiciclina (efectividad tomada para el análisis estadístico = 0.9) en dosis oral de 100 mgr cada 12 horas por 7 días, después de 7 días de la última toma se obtuvieron las muestras de control.

En el grupo A, de las 7 pacientes, 6 mostraron inclusiones citoplasmáticas con la coloración variante de nuestro laboratorio y 2 pacientes mostraron dichas inclusiones con el Papanicolaou. Se demostró con la prueba estadística Binomial que probablemente 6 de las 7 pacientes tuvieron infección por clamidias ($p=0.372$) y que en el 100% de los casos nuestra coloración variante demostró inclusiones citoplasmáticas, mientras que el Papanicolaou lo hizo en el 33%. Lo anterior fue corroborado morfológica y estadísticamente ($p=0.124$) en las láminas controles con la negativización post-tratamiento de las células multivacuoladas.

En relación al criterio citológico de selección del grupo B de pacientes, se ha concluido que los gránulos intra-citoplasmáticos que se hallan en las células parabasales o en las intermedias bajas, no tienen ninguna relación con clamidias.

Finalmente, se demostró la utilidad de nuestra coloración variante (superior al Papanicolaou) en el diagnóstico de clamidiasis cérvico-vaginal.

SUMMARY

A prospective study with 1569 patients from Francisco Pizarro Clinic-Ipss was designed to assess diagnostic improvement with the addition of buffered Wright solution to standard Papanicolaou staining technique, to enhance visualization in cervicovaginal smears as it had been observed empirically in our lab setting.

Patients were divided into two groups. Group A selection criteria was the presence of multivacuolated cells and Group B selection criteria was the presence of non vacuole-included granules in the cytoplasm of lower intermediate epithelial cells and parabasal cells.

Seven patients were included in Group A and 16 in Group B.

Two slides for each patient vaginal smear were obtained before and after treatment, one coloured with Papanicolaou stain and another with the staining variant. Patients received oral doxycycline 100 mg. Bid for 7 days. For statistical analysis 0.9 was fixed as effectivity index. Post-treatment vaginal smear samples were obtained a week after completing treatment.

Six out of seven Group A-patients showed cytoplasmic inclusions coloured with the staining variant. Only two patients showed these inclusions with Papanicolaou stain. A binomial statistical test demonstrated that 6 of 7 patients had chlamydial infection ($P=0.372$) and with staining variant 100% of cases showed this characteristic. All of these findings were confirmed morphologically and statistically ($P=0.124$) with the control smear slides showing post-treatment absence of multivacuolated cells.

Concerning the cytologic selection criteria for group B-patients it was concluded that intra-cytoplasmic granules found in parabasal or lower intermediate cells had no relationship with chlamydia.

I. INTRODUCCION

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis*, cada vez son más frecuentes en el mundo, especialmente las infecciones en los órganos sexuales.

El mayor problema que presenta en la actualidad la detección de los pacientes por este tipo de microorganismo patógeno intracelular, es que el diagnóstico definitivo se basa en su aislamiento a través de los cultivos celulares (circunscritas sólo a los laboratorios de investigación), que mediante la coloración con sustancias yodadas, las células cultivadas infectadas por clamidias evidencian las inclusiones características dentro del citoplasma; para resolver dicho problema de diagnóstico se está utilizando en la actualidad pruebas inmunológicas (3,10,18) (en nuestro país son escasos los laboratorios que cuentan con dichas técnicas y en el IPSS no lo tenemos), pero cuya especificidad y sensibilidad no es igual a la de los cultivos; el costo de los cultivos celulares y de las pruebas inmunológicas son relativamente altos como para ser utilizados rutinariamente.

El diagnóstico de clamidias especialmente las cérvico-vaginales mediante la citología (Papanicolaou) no es concluyente, porque no sólo no se observa en todos los casos las inclusiones citoplasmáticas de las células infectadas, sino que tampoco todas las inclusiones citoplasmáticas observadas corresponden a clamidias (2,4,7,8). Por ello, el gran volumen de pacientes en todo el mundo que anualmente realiza el despistaje citológico de cáncer cervico-vaginal no es aprovechado a cabalidad (en cuanto a infecciones por clamidia); por lo que es importante contar con un método de diagnóstico que además de servir para el diagnóstico de cáncer, sirva también para el diagnóstico de clamidias (15)

En nuestro laboratorio, empíricamente observamos que adicionando a la coloración de Papanicolaou (PAP) una solución de Wright bufferizada obteníamos una variante de la coloración (PAP-V), que mostraban inclusiones

citoplasmáticas en citologías cérvico-vaginales sugestivas de infección clamidiásica con el PAP; por ello el presente trabajo prospectivo fue hecho para evaluar nuestra PAP-V en el grado de certeza diagnóstica de clamidias, ya que de este modo habremos dado un paso muy importante en el diagnóstico de clamidias, puesto que todo el caudal de pacientes de los despistajes de cáncer cérvico-vaginal nos servirá también para detectar los casos de clamidiasis cérvico-vaginal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudiamos citológica y prospectivamente durante marzo-julio de 1996 en el Laboratorio de Anatomía Patológica, 1569 pacientes que venían de los Servicios de Gineco-Obstetricia de la Clínica "Francisco Pizarro"-IPSS, la secreción cérvico-vaginal de cada paciente se extendía en dos laminas (láminas gemelas) fijadas con laca de cabello, una de ellas se coloreó con el método de PAP variante Takahashi (17) y la otra lámina con nuestra variante (PAP-V).

El procedimiento del PAP-V es el siguiente:

- Se lavan las láminas durante 3 minutos en agua corriente (con movimientos suaves y constantes de la canastilla).
- Wright bufferizado (2 minutos)
- Enjuagar en agua corriente
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- Agua destilada (5 inmersiones)
- Hematoxilina de Harris (5 minutos)
- Agua destilada (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- CIH al 1%-Alcohol etílico al 70% (2 segundos)
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- Amoniaco al 3%-alcohol etílico al 70% (30 segundos)
- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)

- Alcohol etílico al 70% (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 95% (5 inmersiones)
- Orange G (2 minutos)
- Alcohol etílico al 95% (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 95% (5 inmersiones)
- EA-36 (6 minutos)
- Alcohol etílico al 95% (5 inmersiones)
- Alcohol etílico al 95% (5 inmersiones)
- Alcohol absoluto (5 inmersiones)
- Xilol (2 minutos)
- Xilol (2 minutos)
- Montaje con bálsamo de Canadá.

El Wright bufferizado se preparó del siguiente modo:

- **Solución de Wright:** 2.4 gramos de colorante Wright se disuelve en un litro de metanol y se deja madurar por 48 horas.
- **Solución buffer:** se prepara una solución madre de Cloruro de Calcio al 10% en agua destilada, se toma 1 cc de esta solución y se disuelve en un litro de agua destilada.
- Se mezcla el colorante Wright con la solución buffer en una proporción de 4/3 (en nuestro caso particular para nuestra cubeta de coloración utilizamos 120 cc de colorante Wright con 90 cc de solución buffer).

Las baterías de coloración tanto del PAP como del PAP-V se cambian cada 200 láminas coloreadas.

Los criterios citológicos para elegir a las pacientes, para que ingresen a la prueba terapéutica con doxiciclina, fueron de 2 grupos:

- A- Citologías que muestran células epiteliales con múltiples vacuolas (3 o mas vacuolas en el citoplasma), basándonos en la fisiopatología de la clamidia (9,13).
- B- Citologías que presentan células epiteliales intermedias bajas o parabasales, con presencia de gránulos intra-citoplasmáticos sin ser incluidas en una vacuola y que necesitamos investigar para ver si tiene relación con clamidias.

Los criterios de exclusión de pacientes fueron que:

La prueba terapéutica no sea aceptada por el paciente y/o su pareja sexual; hipersensibilidad a las tetraciclinas; que hayan recibido tetraciclinas o eritromicinas o sulfametoxazol-trimetoprim sistémico hasta antes de 2 semanas; gestantes; madres que estén lactando; pacientes con criterios citológicos de vaginitis bacteriana (19), tricomoniasis, moniliasis, infecciones virales, displasias y cánceres.

En ambos grupos, con la primera lámina que cumplía con los criterios citológicos mencionados, inmediatamente se ingresaba a la paciente para la prueba terapéutica, ya no se estudiaba la lámina gemela sino hasta después de obtener las láminas de control, como más adelante se especifica.

A las pacientes seleccionadas y a sus parejas sexuales se le administró vía oral doxiciclina (100 mg cada 12 horas por 7 días), tuvieron abstinencia sexual durante el tratamiento y hasta 7 días posteriores, fecha en la cual se tomó el control citológico a la paciente (también con doble lámina: una parte el PAP y otra para el PAP-V).

En el grupo A tuvimos 7 pacientes y en el B 16 pacientes.

Cuando se obtuvieron todas las láminas citológicas (92 láminas en total que incluyen a las muestras pre-tratamiento como las controles), un personal técnico cubrió los números de la rotulación original de la lámina, lo mezcló al azar, luego rotuló con numeración correlativa y fueron evaluados, de este modo al momento del estudio de cada lámina no sabíamos si eran láminas pre-tratamiento o controles, así como también desconocíamos si fueron coloreadas con el PAP o el PAP-V.

Se considera inclusión citoplasmática a la presencia forme intracitoplasmática que está dentro de una vacuola en una célula epitelial (14), y cuya búsqueda la realizamos con el objetivo de inmersión (100X).

Para la evaluación estadística tomamos como eficacia terapéutica 0.9 de la doxiciclina (en relación a las clamidias), que es un promedio de lo descrito en la literatura (1,6,12). Para el grupo A de pacientes utilizamos la prueba de probabilidad Binomial y para el B la prueba del Chi cuadrado.

III. RESULTADOS

En las citologías de las 7 pacientes del grupo A (presencia de células epiteliales multivacuoladas), la presentación de las inclusiones ciotoplasmáticas se observan en la tabla I.

Tabla I: Hallazgo de inclusiones citoplasmáticas en la secreción Cérvico-vaginal de 7 pacientes que recibieron doxiciclina y que presentan en su citología células multivacuoladas. Clínica Francisco Pizarro - IPSS - Marzo - julio de 1996

PACIENTE	PAP		PAP-V	
	PRE-TX	POS-TX	PRE-TX	POS-TX
1	+		+	
2			+	
3			+	
4*				
5			+	
6	+	+	+	
7			+	

PAP : Coloración de Papanicolaou

PAP-V : Coloración variante de nuestro laboratorio

PRE-TX : Pre-tratamiento

POS-TX : Post-tratamiento

+ : Presencia de inclusiones citoplasmáticas

* : Presentaron tanto en el pre como post-tratamiento células multivacuoladas con ambas coloraciones.

La Tabla II muestra el efecto de la doxiciclina en relación a las células multivacuoladas.

Las Inclusiones citoplasmáticas con la coloración PAP-V son de color púrpura, el tamaño y la forma son variables, se han observado ovoides y también de aspecto de nebulosa (ver Fig. 1-3).

En la citología de las 16 pacientes del grupo B (células intermedias bajas o parabasales con gránulos intracitoplasmáticos sin ser incluidos en una vacuola) (ver Fig. 4), con el PAP se encontraron 15 pacientes positivas a estos gránulos antes del tratamiento, de las cuales 8 se negativizaron y 7 permanecieron positivas post-tratamiento con doxiciclina; mientras que con el PAP-V fueron 13 pacientes positivas pre-tratamiento, se negativizaron 3 y permanecieron positivas 10 pacientes post-tratamiento.

Tabla I: Hallazgo citológico de células multivacuoladas en la secreción cérvico-vaginal de 7 pacientes que recibieron doxiciclina Clínica Francisco Pizarro - IPSS - Marzo - julio de 1996

PACIENTE	PAP		PAP-V	
	PRE-TX	POS-TX	PRE-TX	POS-TX
1	+		+	
2	+		+	
3	+		+	
4	+	+	+	+
5	+		+	
6	+	+	+	+
7	+		+	

- PAP : Coloración de Papanicolaou
- PAP-V : Coloración variante de nuestro laboratorio
- PRE-TX : Pre-tratamiento
- POS-TX : Post-tratamiento
- + : Presencia de células multivacuoladas

Figuras 1-4: Las figuras 1 y 3 muestran las inclusiones citoplasmáticas (IC) ovoides en células epiteliales vacuoladas; en la figura 2 son del tipo nebulosa. La Fig. 4 muestra los gránulos intracitoplasmáticos (G) que no tienen relación con Chlamidias. Figs. 1-4: Coloración variante de Papanicolaou de nuestro laboratorio; 1000X.

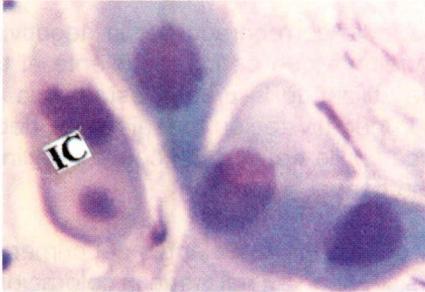


Figura 1

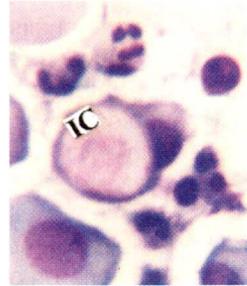


Figura 2

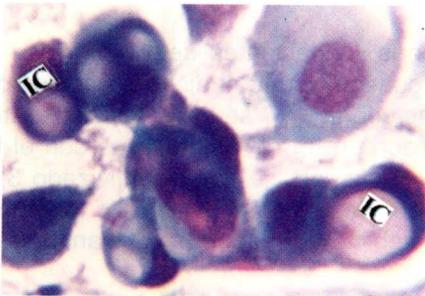


Figura 3

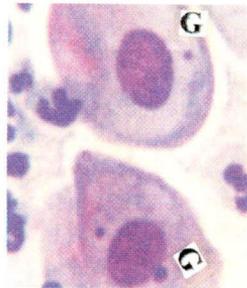


Figura 4

IV. DISCUSION

En el grupo A de pacientes aplicando la prueba Binomial, la probabilidad de que las inclusiones citoplasmáticas sean clamidias en los 6 casos positivos con el PAP-V (efectividad terapéutica de la doxiciclina tomada en el presente trabajo para el análisis estadístico = 0.9 es muy alta ($p = 0.531$); además la probabilidad de que de los 7 casos, 6 correspondan a clamidias es muy alta ($p = 0.372$).

El resultado del análisis anterior está corroborado por la negativización de las células multivacuoladas (morfología que es independiente al tipo de coloración) post-tratamiento, ya que utilizando la prueba estadística arriba citada es probable ($p = 0.124$) que la negativización señalada se deba a la ausencia de la infección clamidiásica por el tratamiento con doxiciclina y no es probable que se deba a un hecho casual.

Por lo anterior podemos indicar que en los 7 pacientes del primer grupo, probablemente 6 tuvieron clamidiasis cérvico-vaginal y que la coloración PAP-V en el 100% de los casos hizo evidente las inclusiones citoplasmáticas, no así con el PAP donde sólo en el 33% de los casos se pudo evidenciar dichas inclusiones.

En las citologías de las personas 16 pacientes del grupo B se puede inferir, aplicando la prueba del Chi cuadrado, que si dichos gránulos corresponden a clamidias, de 15 positivos con el PAP se espera que negativice a 13.5, sin embargo se han negativizado en 8; de 13 positivos con el PAP-V se espera que negativice a 11.7 y realmente se han negativizado 3; estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.01$), por lo tanto los gránulos intra-citoplasmáticos en mención no corresponden a clamidias.

Finalmente, creemos que con la información que estamos presentado, la coloración del PAP-V es útil en el diagnóstico de clamidias, por lo que debemos proseguir la investigación del PAP-V en relación con los cultivos celulares, de comprobarse la utilidad diagnóstica que con este trabajo se ha demostrado, habremos dado un paso muy importante pues el PAP-V es un método diagnóstico sencillo, rápido (menos de 30 minutos), de bajo costo (adiciona menos de 0.03 dólares americanos al costo del PAP por lámina) y sobre todo podremos aprovechar al máximo los despistajes anuales de cáncer cérvico-vaginal para detectar las infecciones por clamidias, que en la actualidad constituye una de las enfermedades de transmisión sexual más importantes en todo el mundo (20).

V. BIBLIOGRAFIA

- 1- Bowie WR: In vitro and vivo efficacy of antimicrobials against Chlamydia trachomatis. **Infection** 10 (Suppl I): S46 - S51. 1982.
- 2- Caudill J; Humphrey SK; JR : Cervicovaginal cytology and the diagnosis of Chlamydia trachomatis: a comparison with immunofluorescent result. **Diagn Cytopathol.** 11 (1):20-2. 1994.
- 3- Fonseca K; Megran DW; Anand CM : Detection of Chlamydia trachomatis antigen by enzyme immunoassay: importance of confirmatory testing. **J Clin Pathol.** 48 (3): 214-7. 1995.
- 4- Geerling S; Nettum JA; Miller S; Dutton L; Wechter S : Sensitivity and specificity of the Papanicolaou-stained cervical smear in the diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. **Acta Cytol.** 29(5): 671-5. 1985.
- 5- Johannisson G; Lowhagen GB; Lycke E : genital Chlamydia trachomatis infection in women. **Obstet Gynecol.** 56: 671-5. 1980.
- 6- Johannisson G; Sernryd A; Lycke E : Susceptibility of Chlamydia trachomatis to antibiotics in vitro and in vivo. **Sex Transm Dis.** April-June: 50-7. 1979.
- 7- Kiviat NB; Paavonen JA; Brockway J; Critchlow C; Brunham RC; Stevens CE; Stamm WE; Kou CC; Derouen T; Holmes KK : Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. **JAMA** 253 (7): 989-1000. 1985.
- 8- Lindner LE; Geerling S; Nettum JA; Miller SL; Altman KH : The cytologic features of Chlamydial cervicitis. **Acta Cytol.** 29(5): 676-82. 1985.
- 9- Mims CA; Playfair J et. Al. : Microbiología Médica. Edit Mosby/Doyma Libros. 1ra ed esp. 1995. Pag. 24.8-24.9.
- 10- Nowinski RC; Tam MR; Goldstein LC et. Al.: Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. **Science** 219: 637-44. 1983.

- 11- Ripa KT; Svensson L; Mardh PA; Westrom L : Chlamydia trachomatis cervicitis in gynecologic outpatients. **Obstet Gynecol.** 52: 698-702. 1978.
- 12- Sander LL; Harrison RH; Washington E : Treatment of sexually transmitted Chamydial infections. **JAMA** 255(13): 1750-6. 1986.
- 13- Schachter J. Chlamydial infections (first of three part) **N Engl J Med.** 298: 428-35. 1978.
- 14- Shiina Y : Cytomorphologic and Immunocytochemical studies of Chlamydial infections in cervical smears. **Acta Cytol.** 29(5): 683-91. 1978.
- 15- Stamm WE : Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary infections. **Ann Inter Med.** 108(5): 710-6 1988.
- 16- Svensson L; Westrom L; Mardh PA: Chlamydia trachomatis in women attending a gynecological outpatient clinic with lower genital tract infections. **Br J Vener Dis.** 57: 259-62. 1981.
- 17- Takahashi M : Citología del Cáncer. Edit. Med. Panamericana, 2da Ed. 1985, pag: 79.
- 18- Tam MR; Stamm WE; Handsfield HH; Stephens R; Kuo CC; Holmes KK; Ditzenberger K; Krieger M; Nowinski R : Culture - independent diagnosis of Chlamydia trachomatis using monoclonal antibodies. **N Engl J Med.** 310: 1146-51. 1984.
- 19- Vela CT; Mendoza N : Diagnóstico citológico y Gram de la vaginosis bacteriana. **Rev Med IPSS.** 4(1): 53-8. 1995.
- 20- Weinstock H; Dean D; Bolan G : Chlamydia trachomatis infections. **Infect Dis Clin North Am.** 8(4): 797-819. 1994.