

APLICAÇÃO DA CITOPATOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DAS LEVEDURAS CERVICO/VAGINAIS.

CITOPATHOLOGY APPLICATION IN LIQUID MEDIUM IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CERVICAL/VAGINAL YEAST.

Luciana **STABACH**², Yaskara **MAGRIN**², Henrique Jin Son **KIM**², Siumara **TULIO**², Luiz Martins **COLLAÇO**¹, Alexandre Karam **MOUSFI**¹, Gilberto **PASCOLAT**¹, Manuel Muiñoz **VAZQUES**¹, Marcelo Tizzot **MIGUEL**¹, Paulo Fernando **SPELING**¹.

Rev. Méd. Paraná/1412

Stabach L, Magrin Y, Kim HJS, Tulio S, Collaço LM, Mousfi AK, Pascolat G, Vazques MM, Miguel MT, Speling PF. Aplicação da Citopatologia em meio líquido no diagnóstico diferencial das leveduras cervico/vaginais. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2016;74(2):18-22.

RESUMO - Objetivos: Analisar em preparados em base líquida a percentagem de diagnósticos de *Candida sp.*, diferenciar e analisar a prevalência das espécies em relação à faixa etária das pacientes e verificar se há relação entre elas. Método: Foi realizado um estudo longitudinal retrospectivo de 174 amostras com diagnóstico de *Candida sp.* em material de citologia cérvico-vaginal colhidas em base líquida. Foi analisada a eficácia na detecção de *Candida sp.* através do método de citologia, dentre 5543 amostras realizadas. Resultados: Houve na amostra 176 (3,2%) diagnósticos de *Candida sp.*, das 174 amostras 159 (91,4%) corresponderam a *Candida albicans*, 8 (4,6%) o *Geotrichum candidum* e 7 (4%) a *Candida glabrata*. Conclusão: A citologia detectou 3,2% de *Candida sp.*, foi possível diagnosticar as espécies de Cândia em todos os casos estudados observando-se predomínio da *Candida albicans* (91,4%). Não houve relação entre a espécie de *Candida sp.* e a faixa etária das pacientes.

DESCRITORES - Citologia cervicovaginal, Citologia em meio líquido, Papanicolaou, Candidíase, Vulvovaginite.

INTRODUÇÃO

A vulvovaginite causada pela *Candida sp.* é um processo infeccioso no trato geniturinário inferior feminino, sendo a segunda queixa mais comum em consultórios ginecológicos de rede pública e privada em diversos países do mundo. O que costuma variar é o motivo da consulta, já que na prática diária podem existir três tipos de pacientes apresentando a Candidíase vulvovaginal (CVV). Algumas mulheres são diagnosticadas ao acaso, devido ao exame de rotina (Papanicolaou), sem apresentar qualquer tipo de sintoma ou histórico de recorrência anterior de candidíase. Existem também aquelas mulheres que já possuem histórico recorrente da infecção e procuram o consultório com sintoma, encontram a vulvovaginite por candida em seu exame de rotina, confirmando o diagnóstico clínico. O terceiro tipo de pacientes engloba aquelas que são sintomáticas

e procuram o ginecologista por sua primeira infecção, sem histórico prévio^(3,5).

O gênero Cândia pertence ao reino Fungi, grupo Eumycota, filo euteromycota, classe Blastomycetes e faz parte da família Criptococcacea. Existem inúmeras espécies que habitam comensalmente a flora natural humana, mas algumas delas possuem um interesse clínico específico devido a sua capacidade de causarem infecções sintomáticas. As principais espécies de interesse médico são: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*⁽¹⁾. Em exames microscópicos é possível a diferenciação morfológica de cada uma das espécies de *Candida*, método que vem sendo utilizado para o tratamento específico das infecções que não apresentam melhora clínica significativa ao tratamento convencional^(2,3,4).

O diagnóstico citopatológico do agente causa-

Trabalho realizado no Laboratório de ANNALAB - Anatomia Patológica e Citopatologia e Faculdade Evangélica do Paraná, PR, Brasil.

1 - Docente do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

2 - Acadêmicos do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

dor da infecção é importante para o encaminhamento correto do tratamento, diminuindo o número de casos. (6)

A técnica em meio líquido também demonstrou vantagem no diagnóstico de *Candida sp.*, principalmente porque o processamento realizado pelo método faz com que os organismos fiquem em uma maior concentração nos preparados e apareçam mais evidentemente nas lâminas, comparando com o método convencional de Papanicolaou (7). Alguns estudos também demonstraram que a técnica em meio líquido permite uma maior quantidade de lâminas apresentando moderada quantidade de células epiteliais e uma melhor visualização das hifas e/ou pseudo-hifas (7). Essas melhorias da técnica convencional e o tamanho das leveduras podem explicar o motivo do exame em meio líquido ser mais eficaz para a detecção e diferenciação das espécies de *Candida sp.* (8).

O presente estudo visa analisar em preparados em base líquida a percentagem de diagnósticos de *Candida sp.*, diferenciar e analisar a prevalência das espécies em relação à faixa etária das pacientes e verificar se há relação entre elas.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado estudo longitudinal retrospectivo de casos com diagnóstico de *Candida sp.*, em material de citologia cérvico-vaginal colhidas em base líquida a partir dos arquivos eletrônicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citologia - Annalab - Curitiba - PR, separados dentre aqueles provenientes de consultórios médicos privados com diagnóstico de *Candida sp.* no período compreendido entre março de 2012 e abril de 2013.

Analisou-se a eficácia na detecção de *Candida sp.* através do método de citologia em base líquida. Classificaram-se os subtipos de *Candida sp.* e a sua prevalência nas amostras. Ainda foi comparada a faixa etária das pacientes com os subtipos de *Candida sp.*

Os examinadores (citotécnicos e patologistas) receberam instruções teórico-práticas para reconhecer e classificar morfológicamente as espécies de *Candida sp.*, de forma padronizada empregando os critérios descritos por Machado (11). A *Candida albicans* - hifas ou micélios de cor rosada ou marrom castanha com filamentos de aspecto reto ou encurvados, com o comprimento variável. Podem ser curtos ou longos, geralmente segmentados. São sempre mais espessos e mais compridos do que as formas filamentosas do bacilo de Döderlein, geralmente estão acompanhados de esporos de forma ovóide ou arredondados, que possuem a mesma cor e são rodeados por um pequeno halo esbranquiçado. Os esporos também podem ser observados isolados ou em pequenos grupos na periferia das células ou ainda junto de leucócitos ou no interior de células (Figura 01). A *Candida glabrata* - leveduras que medem de 2,5 a 5 micra de diâmetro. São redondas

ou ovais, podem mostrar gemulação solitária e também apresentar uma pseudocápsula. São vistas em grupos e se apresentam, na coloração de Papanicolaou, como leveduras encapsuladas. Raramente apresentam pseudo-hifas e ascósporos. O *Geotrichum candidum* - apresenta hifas grossas, segmentadas em artrósporos que variam em tamanho e forma, sendo arredondados ou retangulares. É a única das três leveduras que apresenta verdadeiros micélios (hifas) com protoplasma contínuo da haste principal para as ramificações (Figura 02).

FIG. 01: MICROSCOPIA *C. ALBICANS* (PAPANICOLAOU X 100)

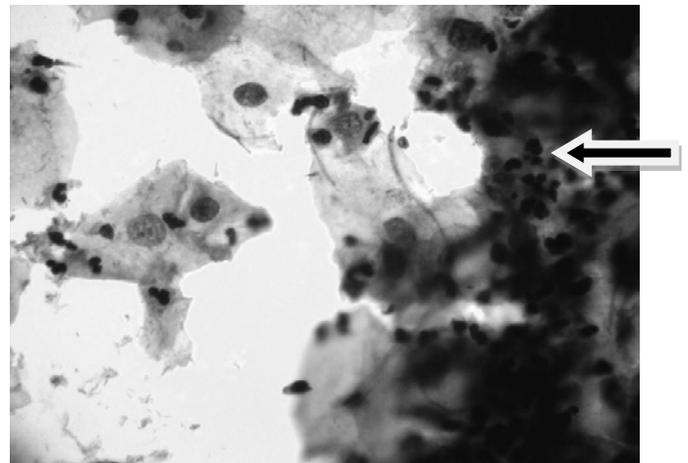
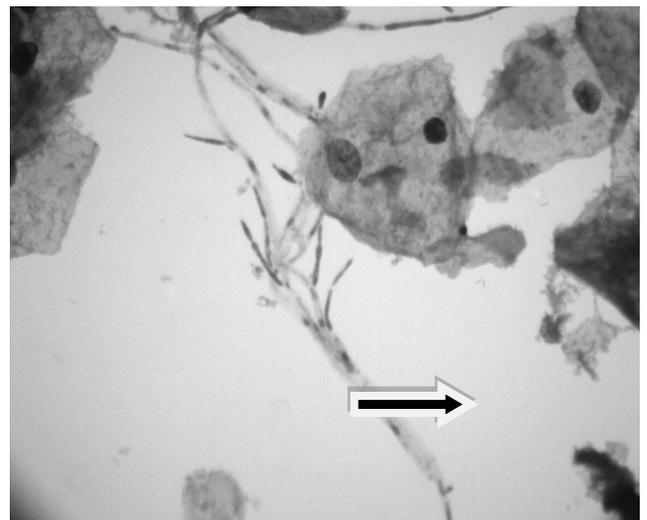


FIGURA 02: MICROSCOPIA *G.CANDIDUM* (PAPANICOLAOU X 100)



Do total de 5543 amostras, foram avaliadas 174 amostras com diagnóstico de candidíase vulvovaginal, diferenciando a espécie de *Candida sp.* A idade das pacientes, foi obtida de 96 das 174 amostras que continham a informação.

Para estimar o percentual de casos de acordo com a espécie da Cândida foram construídos intervalos de 95% de confiança.

A avaliação da associação entre faixa etária (até 30 anos, de 30 a 40 anos e mais de 40 anos) e a espécie de Cândida foi feita usando-se o teste de Qui-quadrado.

Para a comparação das espécies em relação à média de idade, foi considerado o modelo de análise da variância com um fator (ANOVA). Em todos os testes estatísticos valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Sociedade Beneficente Evangélica de Curitiba, sob o parecer de número 241.459 .

RESULTADOS

Foi avaliado o total de exames realizados no período de março de 2012 até abril de 2013, totalizando 5543 exames em base líquida. Em 176 deles foi encontrado o diagnóstico de *Candida sp.*, representando 3,2% dos exames em base líquida .

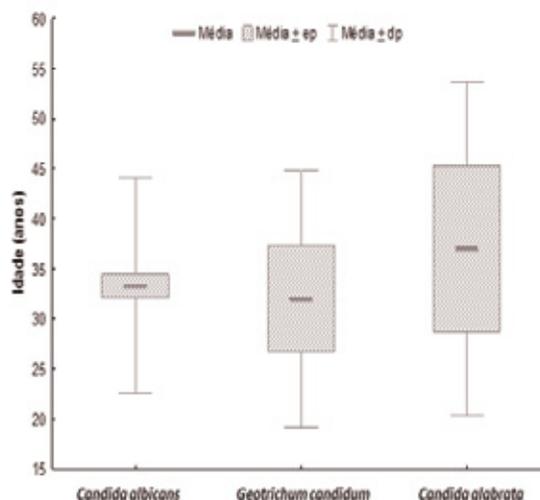
Do total de 5543 amostras confeccionadas em meio líquido, 174 demonstraram o diagnóstico de *Candida sp.* e foram selecionadas para a análise. Quanto a subespécie de *Candida sp.* encontrada, a *Candida albicans* representou 91,4% das amostras analisadas, sendo encontrada em 159 casos. A espécie *Candida glabrata* foi encontrada em 4%, representada por um total de 7 amostras. A subespécie *Geotrichum candidum* representou 4,6 % das amostras, 8 apresentavam esse agente (Tabela 01).

TABELA 01: FREQUÊNCIAS E PERCENTUAIS EM RELAÇÃO A AS ESPÉCIES DE CÂNDIDA

Espécie de Cândida	Frequência	Percentual	IC 95% para o percentual
<i>Cândida albicans</i>	159	91,4	87,2 – 95,5
<i>Geotrichum candidum</i>	8	4,6	1,5 – 7,7
<i>Cândida glabrata</i>	7	4,0	1,1 – 6,9
Total	174	100,0	

Foram analisados 96 prontuários que informavam a idade das mulheres que apresentaram vulvovaginite. A média de idade encontrada foi de 33,36 anos, a mediana representada foi de 30 anos (desvio padrão de 11; idades entre 18 e 61 anos) e a moda 25 anos. Considerando apenas as amostras com a espécie *Candida albicans*, um total de 86 dos 96 prontuários avaliados, a média de idade foi de 33,29 anos, a mediana de 30,5 anos e a moda encontrada foi de 25 anos (desvio padrão 10,8; idades entre 18 e 59 anos). Já a espécie *Candida glabrata* foi relatada em 4 casos analisados, a média de idade foi de 37 anos, a mediana de 31,5 anos (desvio padrão 16,6; idades entre 24 e 61 anos) . Não houve a moda dentro desses casos, pois as idades não se repetiram. A espécie de *Geotrichum candidum* foi encontrada em 6 casos analisados, obtendo uma média de idade de 32 anos, a mediana de 27,5 anos (desvio padrão 12,9; idades entre 24 e 55 anos) e a moda não foi encontrada (Gráfico 01).

GRÁFICO 01: COMPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CÂNDIDA EM RELAÇÃO À IDADE



EP: ERRO PADRÃO | DP: DESVIO PADRÃO

O valor do p foi de 0,771, demonstrando que não há diferença estatística significativa entre os grupos com relação à espécie de Cândida e a idade (Tabela 02).

TABELA 02 : ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA IDADE DE ACORDO COM AS ESPÉCIES.

Espécie de Cândida	Idade						Valor de p*
	N	Mé-dia	Me-diana	Mí-ni-mo	Má-xi-mo	Desvio padrão	
<i>Candida albicans</i>	86	33,3	30,5	18,0	59,0	10,8	
<i>Geotrichum candidum</i>	6	32,0	27,5	20,0	55,0	12,9	0,771
<i>Candida glabrata</i>	4	37,0	31,5	24,0	61,0	16,6	

*ANOVA COM UM FATOR, $P < 0,05$.

Ainda considerando a idade e a espécie de cândida, os prontuários foram divididos entre três faixas etárias: menos de 30 anos, entre 30 e 40 anos, mais de 40 anos (Tabela 03). O $p = 0,990$ demonstra que não há associação significativa entre a faixa etária e a espécie de cândida.

TABELA 03: RELAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CANDIDA E A FAIXA ETÁRIA

Espécie de Cândida	Faixa etária		
	< 30 anos	30 a 40 anos	Mais de 40 anos
<i>Candida albicans</i>	38 88,37%	26 89,66%	22 91,67%
<i>Geotrichum candidum</i>	3 6,98%	2 6,9%	1 4,17%
<i>Candida glabrata</i>	2 4,65%	1 3,45%	1 4,17%
Total	43	29	24

O resultado do teste estatístico indicou que não existe associação significativa entre a faixa etária e a espécie da Cândida ($p=0,990$).

DISCUSSÃO

O total de exames em base líquida observado no período analisado foi de 5543, sendo que os diagnósticos de *Candida sp.* representaram 3,6%. Outro estudo compreendendo 904 exames obteve uma taxa de 10,4% de diagnóstico de *Candida sp.* ⁽⁸⁾. A literatura relata que o processo de confecção das lâminas em meio líquido pode facilitar a detecção da *Candida sp.* devido ao seu tamanho ⁽⁸⁾.

A vulvovaginite causada por *Candida sp.* é uma das infecções do trato genital feminino mais comuns, apresentando sintomas incômodos à uma boa parte da população feminina. A subespécie mais comumente encontrada na literatura é a *Candida albicans*. Nesse estudo a subespécie totalizou 91,4% dos diagnósticos de candidíase vulvovaginal. Outros estudos apresentaram taxas similares, sendo encontrada 80% em um estudo brasileiro ⁽⁴⁾ e 89,3% num estudo espanhol ⁽¹²⁾. Outro autor ressalta que a *Candida albicans* foi, por muito tempo, considerada único patógeno de importância médica e que a partir de 1980 as outras subespécies passaram a ser motivo de preocupação por infecções recorrentes ⁽¹³⁾. Esse mesmo estudo obteve uma taxa bem menor de *Candida albicans*, de 67,6%, taxa próxima da encontrada por Yücesoy, que foi de 62,5%. Seyfarth encontrou uma taxa de 42,1% de *Candida albicans*.

No nosso estudo a *Candida glabrata* foi encontrada em uma taxa de 4%, concordando com a literatura descrita por Ottero, que evidenciou taxa de 2,7% e o do estudo de Yücesoy e Marol, que encontrou 8% de leveduras da espécie *Candida glabrata*. Esse achado destoa dos outros estudos pesquisados, que encontraram taxas mais elevadas de *Candida glabrata*, como 12,6% ⁽¹³⁾, 12% ⁽¹⁴⁾ e 29,6% ⁽⁵⁾.

Na literatura pesquisada, somente os estudos de

Seyfarth e de Yücesoy encontraram o *Geotrichum candidum*, numa taxa de 1,2% e 0,4% respectivamente. Em nosso estudo foi encontrada uma taxa de incidência de 4,6% nos exames analisados. Tais variações podem estar relacionadas com a técnica empregada e a experiência do observador em detectar esta espécie. É importante ressaltar que o tratamento pode ser modificado ao se diagnosticar uma candida não-albicans, evitando assim o uso incorreto de anti-micóticos e facilitando a cura das vulvovaginites por este agente de infecções ginecológicas.

Considerando a faixa etária, mulheres com menos de 30 anos compõe 44,8% dos nossos diagnósticos. Já a faixa etária entre 30 e 40 anos representou 30,2% dos resultados totais, enquanto a faixa etária acima de 40 anos compreendeu outros 25%. Outro estudo apresentou taxas semelhantes considerando as mesmas faixas etárias, sendo os valores respectivamente de 52,6%, 24,5% e 22,9% ⁽⁸⁾. Isso pode significar que a vulvovaginite afeta mulheres mais jovens com maior frequência, sendo o grupo com menos casos o de mulheres acima dos 40 anos. Há, aqui, a influência de outros fatores, dentre eles as variações hormonais ⁽⁵⁾ e o aumento da acidez vaginal ⁽⁴⁾ que dependem da idade influenciando a proliferação do agente patógeno. Não houve significância estatística ($p=0,99$) na comparação das faixas etárias com a subespécie de *Candida sp.* encontrada, também não há referência dessa comparação em outros artigos presentes em nossa revisão de literatura.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo conclui-se que:

- 1) O exame cérvico-vaginal em base líquida detectou 3,2% de *Candida sp.*
- 2) Foi possível pela técnica empregada a diferenciação das espécies de *Candida sp.* sendo as mais detectadas *Candida albicans* 91,4%, *Candida glabrata* foi encontrada em 4%, e *Geotrichum candidum* em 4,6%.
- 3) A espécie de *Candida sp.* encontrada não possui relação com a faixa etária das pacientes.

Stabach L, Magrin Y, Kim HJS, Tulio S, Collaço LM, Mousfi AK, Pascolat G, Vazques MM, Miguel MT, Speling PF. Citopathology application in liquid medium in differential diagnosis of cervical/vaginal yeast. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2016;74(2):18-22.

ABSTRACT - Objectives: Annalise how prevalent each *Candida sp.* species is in different age groups and if there is any relation between age group and *Candida sp.* species. Methods: Retrospective longitudinal analysis of 174 liquid base exams with diagnosis of *Candida sp.* At the same time, the efficiency of liquid base method was evaluated, considering 5543 exams. Results: 176 (3,2%) cases of the total were diagnosed as *Candida sp.* It was possible to recognize *Candida sp.* species in Papanicolaou. In this study, a total of 174 liquid based smears were evaluated, 159 (91,4%) of this total were *Candida albicans*, 8 (4,6%) were diagnosed as *Geotrichum candidum* and 7 (4%) were *Candida glabrata*. Conclusion: The cytology detected 3,2% of *Candida sp.*, it was also possible to differ *Candida sp.* species in all cases, observing a prevalence of *Candida albicans* (91,4%). It was not possible to relate *Candida sp.* species to patients' age group.

KEYWORDS - Cervical-vaginal cytology, liquid-based cytology, Papanicolaou, Candidiasis, vulvovaginitis.

REFERÊNCIAS

1. Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, Silva NL da, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *J Bras Patol e Med Lab* Vol 47, n 1,(jan/fev 2011), p 31-36. 2011;
2. Boatto HF, Moraes MS de, Machado AP, Girão M, Fischman O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. *Rev Bras Ginecol Obs. SciELO Brasil*; 2007;29(2):80-4.
3. Andrioli JL, Oliveira GSA, Barreto CS, Sousa ZL, Oliveira MCH de, Cazorla IM, et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. *Rev bras ginecol Obs.* 2009;31(6):300-4.
4. Corrêa P dos R, David PR dos S, Peres NP, Cunha KC da, Almeida MTG de. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev Bras Ginecol e Obs. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetria*; 2009;177-81.
5. Cetin M, Ocak S, Gungoren A, Ulvi Hakverdi A. Distribution of *Candida* species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. *Scand J Infect Dis. Taylor & Francis*; 2007;39(6-7):584-8.
6. Esim BE, Kars B, Karsidag AY, Karadeniz BI, Kaymaz O, Gencer S, et al. Diagnosis of vulvovaginitis: comparison of clinical and microbiological diagnosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;282(5):515.
7. Sandrin R, Campagnoli EB, França BHS, Lima AAS de. Comparação entre a citologia em base líquida e a citologia esfoliativa convencional no diagnóstico da candidose bucal. *Rev Odontol UNESP.* 2010;39(1):33-9.
8. Takei H, Ruiz B, Hicks J. Comparison of Conventional Pap Smears and a Liquid-Based Thin-Layer Preparation. *Am J Clin Pathol.* 2006;125:855-9.
9. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet. Elsevier*; 2006;367(9505):122-32.
10. Machado JP, Nascimento AJ, Leonart MSS. Citologia em meio líquido para exame de citologia cérvico-vaginal: Estudo comparativo sobre a atividade fixadora de etanol e de formaldeído. *Rev do Inst Adolfo Lutz. Instituto Adolfo Lutz*; 2008;67(2):148-55.
11. Machado D. Aplicação da citopatologia no diagnóstico diferencial das leveduras cervico/vaginais. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); 2004;
12. Otero L, Palacio V, Carreno F, Mendez FJ, Vazquez F. Vulvovaginal candidiasis in female sex workers. *Int J STD AIDS. SAGE Publications*; 1998;9(9):526-30.
13. García-Figueroa RB, Araiza-Santibáñez J, Basurto-Kuba E, Bonifaz-Trujillo A. *Candida glabrata*: un oportunista emergente en vulvovaginitis. *Cir Cir. Academia Mexicana de Cirugía, AC*; 2009;77(6):455-60.
14. Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P, Hipler U. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses. Wiley Online Library*; 2012;55(3):276-80.