

Identification of cervicovaginal flora in liquid based Surepath™.

Results of rodeo study.

Stein MD¹, Fregnani JH^{1,2}, Scapulatempo C¹ and Longatto-Filho A^{2,3,4,5}

¹Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil.

²Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil.

³Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal.

⁵ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

Received: February 2015/ Published: April 2015

Corresponding author:

Máira Degiovani Stein

Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil

mairastein@hotmail.com

ABSTRACT

Aim of the study: To evaluate the morphological pattern of cervicovaginal flora elements in liquid based SurePath™ cytology.

Material and methods: During the period between May, 2010 and August, 2011, 10.166 gynecological samples preserved in liquid based SurePath were evaluated at Barretos Cancer Hospital, in order to identify cervicovaginal flora.

Results: Data showed that *Lactobacillus sp* were observed in 48.92% of the exams, Bacilli in 25.19%, Cocci in 11.77%, *Candida sp* in 5.14%, *Gardnerella sp* in 11.41%, *Trichomonas vaginalis* in 0.57% and in 0.02% of the exams the effects of *Herpes virus*. Any microorganism was observed in 2.45% of the exams.

Conclusion: This study demonstrates that the liquid based preparation does not interfere with the identification of cervicovaginal flora.

Key-words: Cervicovaginal flora; liquid based cytology

Identificação de microrganismos em citologias cervico-vaginais em meio líquido Surepath™.

Resultados do Estudo Rodeo.

Stein MD¹, Fregnani JH^{1,2}, Scapulatempo C¹ and Longatto-Filho A^{2,3,4,5}

¹Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil.

²Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil.

³Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal.

⁵ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o padrão morfológico dos microrganismos presentes em exames cervico-vaginais preparados a partir de amostras conservadas em meio líquido SurePath™.

Materiais e métodos: No período de maio de 2010 a agosto de 2011, 10.166 exames citológicos cervicais preservados em meio líquido (SurePath™) e avaliados no Hospital de Câncer de Barretos, com vista à identificação morfológica da flora microbiológica.

Resultados: Do total das amostras analisadas observaram-se *Lactobacillus sp* em 48,92% dos exames, Bacilos em 25,19%, Cocos em 11,77%, *Candida sp* em 5,14%, *Gardnerella* em 11,41%, *Trichomonas vaginalis* em 0,57% e, em 0,02% dos exames havia efeito citopático compatível com vírus do grupo *Herpes*. Em 2,45% dos exames não se observaram microrganismos.

Conclusão: O presente estudo demonstrou que o método de base líquida não interfere com a identificação da flora cervicovaginal.

Palavras-chave: Microflora vaginal, citologia em meio líquido SurePath™

INTRODUÇÃO

O teste de *Papanicolaou* foi desenvolvido pelo médico grego Dr. Georgios Nicholas Papanicolaou (ou George Papanicolaou), que iniciou a investigação citológica com a finalidade de compreender as fases do ciclo menstrual e a atividade hormonal¹. O teste de *Papanicolaou* tem sido utilizado há muitos anos para prevenção do cancro do colo uterino e, desde então, possibilitou não apenas a identificação de alterações celulares mas também de agentes infecciosos do trato genital feminino².

Em muitos países, o método de preparação convencional das amostras foi substituído pela citologia em meio líquido (CML). A CML foi criada com o intuito de diminuir as limitações técnicas da preparação das lâminas, padronizar a coloração e facilitar a detecção de anomalias pela leitura automatizada guiada por computador, ou manual. A CML foi tão bem aceite que hoje é largamente utilizada, mesmo sem o sistema de leitura automatizado³. Os métodos de CML mais utilizados são o SurePath™ e o Thinprep™.

Além das vantagens na preparação da amostra, a CML permite uma melhor randomização das células efetivamente transferidas para as lâminas, evitando perdas indesejáveis da amostra. No método de SurePath™, o material é quase todo processado e resulta numa preparação de células de 13 mm de diâmetro na lâmina⁴.

Na preparação convencional, há documentação da presença da microbiota vaginal residente de acordo com o que foi relatado num estudo realizado na Finlândia, que demonstrou que o esfregaço corado por *Papanicolaou* tem sensibilidade de 0,85 e especificidade de 0,92 para identificar vaginoses bacterianas – *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* e *Prevotella*⁵. Para além disso, um estudo comparativo entre o esfregaço convencional e o processamento em meio líquido pelo método de SurePath™ revelou que a capacidade de detecção de *Candida sp* em meio líquido foi quase o dobro do que no convencional. No entanto, em relação à identificação de *Trichomonas* e *Gardnerella*, as preparações

convencionais permitiram uma melhor detecção⁶.

Os tipos microbiológicos mais frequentemente encontrados nas amostras cervico-vaginais são: *Lactobacillus*, um bacilo gram positivo não patogénico, corado de azul pela coloração de *Papanicolaou*; *Gardnerella vaginalis*, um pequeno bacilo associado a vaginose bacteriana, geralmente muito numeroso, com aparência de filme e que se adere ao citoplasma da célula escamosa formando a “clue cell”³; *Trichomonas vaginalis*, um protozoário em forma de pêra transmitido sexualmente e *Candida sp*, um fungo eosinofílico que aparece em formato de filamentos de hifas ou de esporos³. De referir, ainda, a presença do vírus *Herpes simplex*, que é identificado pelas modificações que causa nas células, como multinucleação, moldagem do núcleo com aparência de vidro e/ou inclusões nucleares eosinofílicas³.

Devido ao facto de o método de preparação da CML eliminar fatores interferentes como o muco e o sangue, recorrentemente restam dúvidas sobre a potencial eliminação da microbiota das preparações cervico-vaginais, o que poderia ser uma desvantagem da CML face à citologia convencional. Ressalve-se que o objetivo primário do teste de *Papanicolaou* está relacionado com a identificação de alterações malignas e pré-malignas do colo uterino, e não com a identificação de agentes etiológicos. Contudo, reconhecendo-se a importância que esta variável pode ter em alguns contextos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia na identificação microbiológica em exames cervico-vaginais em meio líquido armazenados em SurePath™ e corados por *Papanicolaou*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A colheita de material cervico-vaginal foi realizada em mulheres encaminhadas ao ambulatório do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), em mulheres examinadas nas carretas da Prevenção do HCB e em mulheres que passaram por consultas de ginecologia nos municípios que enviaram os exames ao setor de Patologia do HCB, no período de maio de 2010 a agosto de 2011.

De um total de 33,998 exames citológicos cervico-vaginais em meio líquido, avaliados segundo o Sistema *Bethesda* 2001, foram analisados retrospectivamente 10,166 exames selecionados por amostragem aleatória simples.

As amostras foram colhidas em meio líquido SurePath™ (TriPath Imaging, Burlington, NC, USA) e as lâminas processadas pelo PrepMate™ e PrepStain™.

As lâminas foram analisadas por um grupo de 4 citologistas e 2 citotécnicos com experiência entre 2 e 12 anos (média de 6,8 anos) em microscópio de luz, de maneira tradicional. O microscópio utilizado foi o Nikon Eclipse E200 com objetivas panorâmica (4X), nos aumentos de 10X e 40X.

A análise dos dados foi efetuada pelo programa SPSS para Windows® v. 20.0 (Inc., Chicago, IL, USA). Para efetuar a análise estatística foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, o Qui-quadrado e o teste T.

RESULTADOS

No total das amostras analisadas observaram-

se: 4975 (48,92%) casos com *Lactobacillus sp*, 2560 (25,19%) com Bacilos, 1197 (11,77%) com Cocos, 523 (5,14%) com *Candida sp*, 1161 (11,41%) com *Gardnerella*, 58 (0,57%) com *Trichomonas vaginalis* e 2 (0,02%) com efeito citopático do vírus do grupo *Herpes*. Em 249 (2,45%) casos não se observaram microrganismos (Outros) (**Gráfico 1**).

As principais características das pacientes envolvidas neste estudo estão representadas na **Tabela 1**. A idade média das mulheres em estudo foi de 45 anos (D.P. = 13,9), variando de 13 a 96 anos. Ressalta-se que a maioria das mulheres está entre as faixas etárias de 31 a 60 anos e com baixo nível escolar, sendo maioritariamente oriundas, ou pelo menos residentes, no estado de São Paulo (**Tabela 1**).

A **Tabela 2** apresenta a média das idades das mulheres com mais prevalência de cada microrganismo e a **Tabela 3** apresenta as frequências dos microrganismos reconhecidos morfolologicamente nas preparações cervicais preservadas em meio líquido, de acordo com a faixa etária das pacientes.

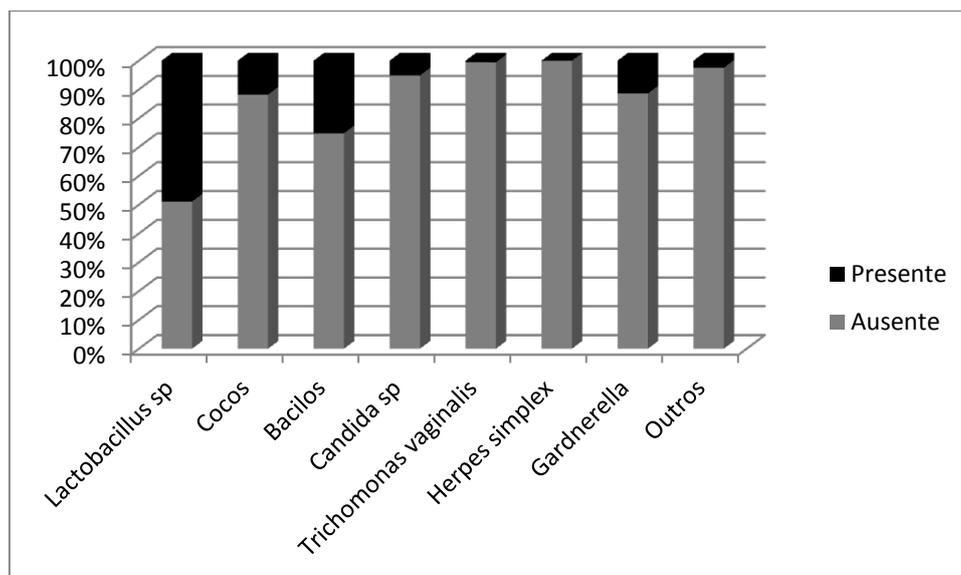


Gráfico 1 – Percentagem dos diferentes microrganismos presentes nas amostras cervico-vaginais.

Tabela 1- Caracterização das pacientes

		n	%
Idade em categorias	11 a 20	367	3.6%
	21 a 30	1369	13.5%
	31 a 40	1917	18.9%
	41 a 50	2733	26.9%
	51 a 60	2271	22.4%
	61 a 70	1178	11.6%
	71 a 80	277	2.7%
	81 a 90	29	0.3%
	91 a 100	3	0.0%
Escolaridade	Sem informação	1370	13.9%
	Analfabeta	1015	10.3%
	1º grau incompleto	3644	36.9%
	1º grau completo	1355	13.7%
	Segundo grau completo	1901	19.2%
	Superior	595	6.0%
Estado de origem da paciente	Goiás	124	1.3%
	Mato Grosso	325	3.4%
	Mato Grosso do Sul	506	5.3%
	Minas Gerais	502	5.2%
	Pará	13	0.1%
	Rondônia	550	5.7%
	São Paulo	7533	78.6%
	Outros	34	0,3%

Tabela 2 – Avaliação da presença dos microrganismos de acordo com as idades das pacientes.

	Presença de microrganismos	Média da idade	Mínimo	Máximo	P valor
<i>Lactobacillus sp</i>	Não	48	14	96	
	Sim	42	13	88	<0,01
Cocos	Não	44	13	96	
	Sim	57	16	91	<0,01
Bacilos	Não	45	13	91	
	Sim	47	14	96	<0,01
<i>Candida sp</i>	Não	46	13	96	
	Sim	38	13	77	<0,01
<i>Gardnella sp</i>	Não	46	13	96	
	Sim	41	15	86	<0,01
<i>Trichomonas vaginalis*</i>	Não	45	13	96	
	Sim	48	20	69	0,71

Utilizado Teste de *Mann-Whitney*. (*Para o grupo *Trichomonas vaginalis*, foi realizado Teste T)

Tabela 3 – Número de pacientes com infecção por microrganismos de acordo com a faixa etária.

Idade	<i>Lactobacillus sp</i>		Cocos		Bacilos		<i>Candida sp</i>		<i>Gardnerella sp</i>		<i>Trichomonas vaginalis</i>		Outros	
	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
11 a 20	212	2,1	9	0,1	81	0,8	48	0,5	64	0,6	1	0,0	0	0
21 a 30	823	8,1	32	0,3	302	3,0	111	1,1	206	2,0	2	0,0	6	0,0
31 a 40	1129	11,1	58	0,6	447	4,4	130	0,1	265	2,6	12	0,1	14	0,1
41 a 50	1524	15,0	163	1,6	649	6,4	143	1,4	368	3,6	20	0,2	23	0,2
51 a 60	880	8,7	474	4,7	636	6,3	72	0,7	197	1,94	16	0,2	81	0,8
61 a 70	338	3,3	370	3,6	333	3,3	13	0,1	50	0,5	7	0,0	82	0,8
71 a 80	55	0,5	81	0,8	98	0,9	6	0,1	7	0,1	0	0	32	0,3
81 a 90	5	0,1	8	0,1	10	0,1	0	0	2	0,0	0	0	3	0,0
91 a 100	0	0	1	0,0	2	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	4966	48,9	1196	11,8	2558	25,2	523	5,1	1159	11,4	58	0,6	241	2,4

*Porcentagem em relação a 10,144 pacientes (ausência de dados relativamente à idade de 22 pacientes)

DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado num centro de referência em prevenção e tratamento de cancro do colo uterino no Brasil, o HCB. No HCB são examinadas anualmente uma média de 150,000 citologias, observadas e analisadas por um grupo de 4 citologistas e 5 citotécnicos. As amostras foram observadas durante a rotina diária do Departamento de Patologia do HCB. Os citologistas intervenientes são altamente qualificados tendo tido formação prévia para a familiarização com a leitura das amostras processadas em meio líquido SurePath™. A formação, que é composta por aulas teóricas e práticas, foi ministrado por profissionais qualificados BD (Becton Dickinson).

As pacientes que fizeram parte do estudo apresentavam entre 13 e 96 anos de idade. Do total de mulheres (10,166) apenas 8,510 responderam no questionário, às questões acerca da escolaridade e destas, a maioria (43%) apresentava o primeiro grau incompleto. O Estado de origem mais frequente foi o Estado de São Paulo, com 78,6% das mulheres, devido à localização do HCB.

A maioria das pacientes apresentou *Lactobacillus sp* (48,9%). Os lactobacilos são responsáveis pela proteção natural do epitélio vaginal, convertem açúcares em ácido láctico e mantêm o pH ácido, auxiliando a

imunidade inata⁷. No que diz respeito às células tumorais cervicais, segundo *Motevaseli et al*⁸ os lactobacilos exercem um efeito citotóxico que é independente do pH e lactato.

Em relação à presença de *Gardnerella sp*, *Candidas sp* e *Trichomonas vaginalis* verificou-se uma percentagem de 11,41%, 5,14% e 0,57%, respetivamente. Contudo, um outro estudo, realizado em Fortaleza (Brasil), demonstrou taxas mais elevadas na deteção de microrganismos, verificando-se 18,6% de *Gardnerella sp*, 5,7% de *Candida sp* e 3,0% *Trichomonas vaginalis*⁹.

No presente estudo, a deteção de *Trichomonas* (0,57%) foi maior do que a encontrada no estudo realizado com o sistema ThinPrep, Cytic (Marlborough, Massachusetts, U.S.A.), no qual foram observadas *Trichomonas vaginalis* em 0,2% das amostras colhidas entre os anos de 2005 a 2008¹⁰.

Segundo as faixas etárias das mulheres estudadas, a maior quantidade de *Lactobacillus* (15,0%), bacilos (6,4%), *Candida sp* (1,4%), *Gardnerella sp* (3,6%) e *Trichomonas vaginalis* (0,2%), foi encontrada em pacientes de 41 a 50 anos, sendo que a maior quantidade de cocos (4,7%) foi registada em pacientes de 51 a 60 anos. A maior quantidade de microrganismos encontrados nas pacientes de 41 a 50 anos pode ser

explicada, em parte, por esta faixa etária englobar a maior quantidade de mulheres presentes no estudo (26,9%).

Num estudo realizado pela Universidade Federal de Goiás, no Brasil, em 2005 verificou-se que a prevalência de microrganismos foi de 20%, 8% e 2% para *Gardnella vaginalis*, *Candida sp* e *Trichomonas vaginalis*, respetivamente, tendo-se registado uma maior frequência em mulheres na faixa etária de 21 a 40 anos¹¹.

CONCLUSÃO

O teste de *Papanicolaou* utilizado principalmente para deteção de lesões precursoras do cancro do colo uterino é também utilizado para a deteção de microrganismos. Os resultados deste estudo mostram claramente que o processo para a preparação da lâmina de material cérvico-vaginal pelo método em meio líquido SurePath™ mantém a presença inalterada de elementos da microbiota, residente ou outra, na maioria das pacientes. Em apenas 2,45% dos casos não se observou qualquer microrganismo.

Este estudo demonstrou que mesmo tendo como objetivo eliminar fatores interferentes na análise citopatológica, o método de base líquida SurePath™ permite a visualização dos microrganismos em citologias cervico-vaginais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bibbo M. IAC Congress Contributes to 21st Century Citology. In: Valente PT, editor. The life of George N Papanicolaou and the Origins of Citology: Cyto Paths; 1999.
2. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal. 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p.21–32.
3. Cibas ES. Cervical and vaginal cytology. In Cibas ES, Ducatman BS, eds. Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates. Edinburgh, Scotland: Saunders; 2003. p. 52-54.
4. Hoda RS, Loukeris K, Abdul-Karim FW. Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: A comprehensive review of similarities and differences. Diagn Cytopathol. 2012.
5. Eriksson K, Forsum U, Bjørnerem A, Platz-Christensen JJ, Larsson PG. Validation of the use of Pap-stained vaginal smears for diagnosis of bacterial vaginosis. APMIS. 2007;115(7): 809-13.
6. Takei H, Ruiz B, Hicks J. Cervicovaginal flora. Comparison of conventional pap smears and a liquid-based thin-layer preparation. Am J Clin Pathol. 2006 Jun;125(6):855-9.
7. Gregorczyk KP, Krzyżowska M. [Innate immunity to infection in the lower female genital tract]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013 May 10;67:388-401.
8. Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi AS, Mirsalehian A, Modarressi MH. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. J Med Microbiol. 2013 Jul;62(7):1065-72.
9. Freitas RW, Marinho NB, Americo CF, Damasceno MC, Fernandes AF, Pinheiro AK. Microbiological agentes in reports: prevalence study. Journal of Nursing UFPE. 2011;5(7).
10. Noël JC, Engohan-Aloghe C. Morphologic criteria associated with *Trichomonas vaginalis* in liquid-based cytology. Acta Cytol. 2010 Jul-Aug;54(4):582-6.
11. Ribeiro AA, Oliveira DF, Sampaio MC, Carneiro MS, Tavares SB Souza NL, et al. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. RBAC. 2007; 39(3): 179-181.