

Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida

Cellularity evaluation in liquid-based cytology preparations

Sonia M. M. PEREIRA^{1*}
Maria Lúcia UTAGAWA¹
Janaina E. PITTOLI¹
Luciana S. AGUIAR¹
Marina Y. S. MAEDA¹
Adhemar LONGATTO FILHO¹
Celso di LORETO¹
Cecília ROTELI-MARTINS²
Janice O. GALVANE²
Cláudia Maria WOLF²
Sonia F. FIGUEIREDO²
Kari SYRJANEN³

RIALA6/937

Pereira, S. M. M. et al - Avaliação da celularidade citológica em preparados de base líquida **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 35 - 39 ,2003.

RESUMO. O método de citologia em base líquida parece apresentar uma série de vantagens em relação ao convencional: melhor disposição celular, facilitando a interpretação; redução do número de hemácias, exsudato inflamatório e muco, preparação de lâminas adicionais do mesmo caso sem ter que se convocar a paciente; utilização de material residual para testes moleculares para identificação de HPV e outros microorganismos. O método de base líquida, pelas vantagens mencionadas, detecta maior número de lesões, além de menor índice de amostras inadequadas ou limitadas por alguma razão. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os achados citológicos obtidos com duas metodologias diferentes de preparo de citologia em base líquida, o novo sistema DNA - CITOLIQ (DIGENE-Brasil) e o sistema Autocyte (TRIPATH, USA), e correlacioná-los com os achados de citologia convencional obtidos da rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz. Foram estudadas 509 amostras consecutivas pelo sistema DNA - CITOLIQ e 398 amostras pelo sistema Autocyte, de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros no ano de 2002, participantes voluntárias do projeto INCODEV ICA4-CT-2001-(10013). Das 509 citologias preparadas pelo método DNA - CITOLIQ (DIGENE-Brasil), 0,6% foram insatisfatórios; 89,3% negativos; 2,0% lesões de baixo grau; 0,8% lesões de alto grau; 0,2% carcinoma e 7,1% ASCUS / AGUS. Apresentou ainda 89% de amostras satisfatórias, 10,0% satisfatórias mas limitadas por ausência de JEC e 0,4% limitadas por outras causas. Pelo método Autocyte, em 398 casos, 0,5% foram insatisfatórios; 88,2% negativos; 3,0% ASCUS / AGUS; 6,8% lesões de baixo grau e 1,5% lesões de alto grau. Apresentou 84% de amostras satisfatórias, 15,25% satisfatórias mas limitados por ausência de JEC e 0,25% satisfatórias mas limitados por outras causas. Foram examinadas 33.313 citologias colhidas pelo método convencional em 2001, onde 5,0% foram insatisfatórios; 92,6% negativos; 1,3% lesões de baixo grau; 0,3% lesões de alto grau e 0,05% de carcinoma invasivo; 0,7 ASCUS / AGUS. Em relação à qualidade da amostra, apenas 22,7% dos casos apresentaram células da JEC. Conclui-se que ambos métodos de citologia em base líquida apresentaram performances semelhantes quanto à qualidade das amostras, com menos casos insatisfatórios que o convencional. Observamos ainda, para ambos métodos, aumento significativo na sensibilidade para detecção de lesões intraepiteliais, sobretudo as de baixo grau, quando comparadas ao método convencional.

PALAVRAS – CHAVE. Citologia de base líquida, HPV, esfregaço cérvico-vaginal.

¹Instituto Adolfo Lutz, ²Hospital Leonor Mendes de Barros, São Paulo, SP; ³Istituto Superiore di Sanità, Roma Itália.

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Divisão de Patologia - Av. Dr. Arnaldo, 351 -7º andar
CEP: 01246-902 – São Paulo – SP – Brasil – e-mail : mirandasmp@ig.com.br

INTRODUÇÃO

A citologia de base líquida surgiu para atender às demandas de escrutínio computadorizado. Para viabilizar a leitura das lâminas por computadores, era necessário um preparado que apresentasse o menor número possível de artefatos e sobreposições celulares; dessa forma, os preparados citológicos em base líquida foram chamados a princípio de citologia de mono camada ou camada fina^{1,2}.

O número de células em meio líquido é considerado ideal, uma vez que ao ser acomodado no recipiente, a quase totalidade das células coletadas são transferidas ao meio. Ao se preparar as amostras, essas células são randomizadas por agitação (independente dos métodos disponíveis no mercado) e oferecem, teoricamente, uma amostra mais representativa. Essa metodologia traz um grande avanço no preparo citológico, uma vez que há evidências de que apenas 20% do material colhido pelo método convencional é transferido para a lâmina; o restante, que está aderido à escova/espátula, é descartado¹. Além disso, tem sido advogado que a citologia de base líquida apresenta uma série de vantagens em relação a citologia cervical convencional, como características citomorfológicas nítidas e de fácil interpretação, melhor disposição celular (distribuição homogênea), menor área de análise. Há, também, evidente redução do número de hemácias, exsudato inflamatório, muco e preparo de lâminas adicionais do mesmo caso sem ter que convocar a paciente e utilização do material residual para testes moleculares para identificação de agentes etiológicos, como o HPV^{3,4}.

A citologia de base líquida é o resultado de mais de uma década de pesquisas, onde se buscou um único meio, com condições de preparo citológico de excelência em fixação, preservação celular e de moléculas proteicas e ácidos nucleicos para estudos biomoleculares¹.

Associada a preservação celular, alguns parâmetros ainda continuam sendo valorizados para o reconhecimento da qualidade de uma amostra como a presença de células da junção escamo-colunar (JEC)^{5,6,7}, e por isso sua presença em meio líquido também tem sido avaliada.

Tem sido relatado também que a citologia de base líquida, pelas vantagens mencionadas, detecta maior número de lesões, além de apresentar reduzidos índices de amostras insatisfatórias ou limitadas por alguma razão^{8,9,10}.

Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico e adequabilidade das amostras de duas metodologias diferentes de preparo de citologia em base líquida e compará-los com os achados de citologia convencional obtidos junto à rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 907 amostras cérvico-vaginais consecutivas preparadas em base líquida, sendo 509 amostras pelo sistema DNA -CITOLIQU® e 398 pelo sistema Autocyte, de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros no

ano de 2002 participantes voluntárias do projeto INCODEV ICA4-CT-2001-(10013).

O Sistema DNA-CITOLIQU® (Digene-Brasil) consiste de um kit de coleta composto por um tubete com 1ml de solução Universal Collection Medium (UCM) e escova. Após a coleta, a escova é colocada dentro do frasco com líquido preservante, quebrando-se a haste da mesma. No laboratório, o tubo com a amostra é homogeneizado em vórtex por 20 segundos; 200µl da amostra são alíquotados e dispensados de maneira uniforme sobre a superfície de uma membrana acomodada em sistema de *imprint* com capacidade para 12 lâminas. O preparado ocupa uma área circular de 25mm de diâmetro. A tampa do suporte do sistema é fechada com o conjunto lâmina/membrana e travada por 10 segundos.

O processo do Sistema Autocyte (Tripath;USA), é composto por um kit com 10 ml de solução preservante e uma escova do tipo Rover's. O frasco é homogeneizado em vórtex, formando uma suspensão randomizada de células. Essa suspensão é removida do frasco de coleta e colocada sobre um líquido de densidade alta dentro de um tubo plástico de centrifugação. O tubo é centrifugado, e o sobrenadante é removido e descartado. O "pellet" é suspenso com 4ml de água deionizada. Dessa solução é retirado 800µl e alocada dentro de uma câmara de assentamento. Após fixação e secagem, as lâminas são coradas. A amostra é distribuída uniformemente sobre uma área de 13 mm de diâmetro.

Para ambos métodos, as lâminas são fixadas imediatamente em álcool absoluto e coradas pelo Método de Papanicolaou.

Todos os casos foram analisados em estudo cego por quatro dos autores (SMMP, MLU, MYSM, ALF). Casos insatisfatórios, suspeitos e positivos foram discutidos por pelo menos três observadores e as discrepâncias resolvidas em reunião de consenso em microscópio de múltipla observação com um citopatologista (CL).

Os resultados obtidos foram comparados com os de 33.313 esfregaços de citologia convencional do ano de 2001 realizado na rotina do Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz

Os resultados do exame de Papanicolaou foram classificados de acordo com o Sistema de Bethesda¹¹.

RESULTADO

A tabela 1 apresenta os percentuais diagnósticos observados nos sistemas de base líquida analisados e no método convencional. Observa-se marcante predomínio de amostras insatisfatórias no método convencional (5%) representando quase 10 vezes mais em relação as observadas em base líquida, independente do sistema.

Os percentuais diagnósticos observados mostram aumento de lesões detectadas pela citologia em meio líquido, onde as LSIL (lesões intraepiteliais de baixo grau) e as HSIL (lesões intraepiteliais de alto grau) também foram mais frequentes do que em esfregaços convencionais.

TABELA 1- Comparação dos dois Sistemas de base líquida com o método convencional.

Diagnóstico	DNA - CITOLIQ (%) n=509	AUTOCYTE (%) n=398	CONVENCIONAL (%) n=33.313
Insatisfatório	0,6	0,5	5
Negativo	89,3	88,2	92,6
Ascus/Agus	7,1	3	0,7
LSIL	2,0	6,8	1,3
HSIL	0,8	1,5	0,3
Carcinoma	0,2	-	0,05

A tabela 2 apresenta um quadro comparativo de qualidade da amostra entre os métodos DNA - CITOLIQ e Autocyte. Nestes, podemos observar semelhanças quanto ao número de casos satisfatórios que chegam a 89% no DNA - CITOLIQ e 84% no Autocyte.

A ausência das células da junção escamo-colunar (JEC) também foi de 10% no sistema DNA - CITOLIQ e 15,25% no Autocyte.

O método convencional apresentou no período analisado, 22,7% de casos com células da JEC.

Mesmo com a introdução de novos instrumentos de coleta como o uso de escovas para a região endocervical, não temos observado aumento de células da JEC no preparado convencional que seja comparável ao observado em base líquida como nesta amostra. Sabemos que esta limitação do método convencional pode estar diretamente relacionada à alta frequência de resultados falso negativos.

Uma outra questão a ser avaliada no método convencional é a amostra insatisfatória. O estudo de Fagundes¹⁵ mostrou que 4,39% das amostras convencionais foram

TABELA 2- Comparação dos Sistemas de base líquida com a amostragem.

Amostragem	DNA - CITOLIQ (%) n=509	AUTOCYTE (%) n=398
Satisfatório	89,0	84,0
limitado por ausência da JEC	10,0	15,25
limitado por outras causas	0,4	0,25

As alterações morfológicas das lesões intraepiteliais encontrados em ambos métodos de base líquida foram as mesmas preconizadas para a citologia convencional.

DISCUSSÃO

Existem estudos que demonstram a importância da representação celular da JEC, como um parâmetro fundamental para a otimização do diagnóstico citológico de amostras cérvico vaginais^{5,6,7,12}. A citologia de base líquida tem sido referida como método de performance superior em relação à citologia convencional¹³. Assim Bishop¹⁴, em análise preliminar concluiu que a base líquida obtém uma melhor representação celular da JEC com sensibilidade superior para a detecção de lesões do que o preparado convencional.

Neste estudo fica claro que os preparados em base líquida oferecem vantagens técnicas importantes em relação à adequação das amostras pois nos métodos de base líquida a JEC esteve representada em 89% e 84% das amostras (DNA - CITOLIQ e Autocyte), enquanto no método convencional a representatividade foi de apenas 22,7%.

classificadas insatisfatórias e destas 55,4% devido a problemas de fixação. Os nossos resultados mostram que nas citologias em base líquida as amostras insatisfatórias corresponderam à cerca de 0,5%, independente do sistema utilizado. Nosso índice de insatisfatórios em casos convencionais é de 5%, semelhante aos dados da literatura. Com a metodologia em base líquida, não observamos problemas com relação à fixação. Após a coleta, a amostra é colocada imediatamente em líquido preservante; o preparado é confeccionado e fixado no laboratório, não havendo interferências nesse sentido.

A diferença de frequências de lesões do colo uterino deve ser avaliada com cuidado. A uma primeira análise, o exame convencional não apresentou igual desempenho dos métodos em base líquida. Entretanto, deve-se ressaltar que os casos convencionais avaliados nesse estudo referem-se a uma grande variedade de condições de mulheres atendidas em um sistema de prevenção de câncer da rede pública. Já as mulheres atendidas pelo projeto INCODEV, embora não tenham história clínica de lesão de colo uterino, pertencem a um único ambulatório especializado em atendimento a mulher. Essa diferença de população alvo pode ter induzido, em parte, as diferenças

encontradas nas frequências das lesões do colo uterino. Outra variável a ser considerada é a baixíssima frequência de células da JEC na casuística convencional, em diferentes coletas, e que pode, também, ter influenciado os diagnósticos. Essas diferenças, porém, não justificam a deficiência dos preparados convencionais em relação ao de base líquida no que se refere à qualidade das amostras.

O parâmetro de qualidade em relação a coleta também deve considerar a grande variabilidade dos profissionais que atuam junto a Rede. No hospital Leonor Mendes de Barros, o corpo de profissionais é estável; eventuais não conformidades podem ser diretamente discutidas entre os interessados e ações corretivas podem ser implementadas de imediato. Os ambulatórios da Rede Pública apresentam maior mobilidade de seus quadros influenciando negativamente na eficácia das ações de treinamento e educação continuada. Apesar disso, anualmente cerca de 1000 profissionais de enfermagem são

treinados pela Fundação Oncocentro para otimizar as ações de qualidade na Rede Pública de Saúde mostrando que há melhoria quando há treinamento (Fundação Oncocentro, São Paulo, 2002 – dados não publicados).

Fica-nos claramente a impressão de que os preparados de base líquida oferecem melhor qualidade quando diminuí drasticamente os casos insatisfatórios e com limitações, sobretudo relacionados à presença de células glandulares. As dimensões e a limpeza do preparado em base líquida também oferecem maior conforto visual ao observador e restringem a área de observação aumentando a chance de observação de alterações celulares.

Embora o esfregaço convencional ainda seja preconizado para o escrutínio de lesões de colo uterino em grandes populações, parece-nos evidente a vocação dos preparados de base líquida para otimizar qualitativamente o teste de Papanicolaou.

RIALA6/937

Pereira, S. M. M. et al - Cellularity evaluation in liquid-based cytology preparations. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 35 - 39, 2003.

ABSTRACT. Liquid-based cytology (LBC) presents several advantages when compared to the conventional smears, such as clean background, residual material for additional cytological preparations or even for molecular tests to infectious agents identification, mainly HPV. Besides these advantages, LBC detects more lesions than the conventional smears, and also reduce the number of unsatisfactory samples and false negative cases. The goal of this work was to evaluate the cytologic findings of two different LBC methodologies, DNACITOLIQ[®] (DIGENE-Brasil) and Autocyte system (Tripath, USA) concerning the adequacy of the samples and diagnosis performance, and compare these results to those reported by conventional smears daily routine analyzed at Adolfo Lutz Institute. A total of 509 samples of DNA- CITOLIQ[®] and 398 Autocyte consecutive cases from women examined at Leonor Mendes de Barros Hospital in 2002 (INCODEV ICA-CT-2001-10013 project) were analyzed. From DNACITOLIQ[®] cases 0.6% were unsatisfactory, 89.3% were negative, 7.1% ASCUS/ AGUS, 2.0% LSIL, 0.8% HSIL and 0.2% squamous carcinoma. Regarding adequacy parameters 89% were satisfactory, 10.0% were limited by absence of glandular cells and 0.4 limited by other reasons. Autocyte system diagnosis were: 0.5% unsatisfactory, 88.2% negative, 3.0% ASCUS/AGUS, 6.8% LSIL and 1.5% HSIL. Conventional smears comprised 33,313 samples where 5.0% were unsatisfactory, 92.6% were negative, 0.7% ASCUS/ AGUS, 1.3% LSIL, 0.3% HSIL and 0.05% squamous carcinoma. Satisfactory samples with glandular cells representation account 22.7%. Both methods of liquid-based cytology have presented similar performances regarding the adequacy of the samples, presenting lesser inadequate cases than the conventional. We have also observed that both methods have showed better sensitivity than the conventional to identify intraepithelial lesions, mainly the low grade.

KEY WORDS. Liquid-based cytology, HPV, cervical smears

REFERÊNCIAS

1. Velasco J Citología Líquida. **VPH Hoje**. 1: 8-9, 2001.
2. Takahashi M; Naito M. Application of the cytorich monolayer preparation system for cervical cytology: a prelude to automated primary screening. **Acta Cytol**; 41:1785-1789, 1997.
3. Gupta PK et al. Processing liquid-based gynecologic specimens; comparison of the available techniques. **Acta Cytol** ; 45: 995-998, 2001.
4. Bernstein SJ.; Sanchez-ramos L.; Ndubisi B. Liquid – based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am J Obstet Gynecol** ; 185: 308-17, 2001.
5. Mitchell H, MEDLEY G. Cytological reporting of cervical abnormalities according to endocervical status. **Br J cancer** 67: 585-588, 1993
6. Aurier P et al . Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uterine. **BJ Cancer** 74: 488-490, 1996.
7. Shirata NK et al. Celularidade dos esfregaços cervicovaginais: importância em programas de garantia de qualidade em citopatologia. **J bras Ginec** 108(3): 63-66, 1998.
8. Marino JF; Fremont-Smith M. Direct-to-vial experience with AutoCyte PREP in a small New England regional cytology practice. **J.Reprod Med**, 46(4): 353-358, 2001.
9. Biscotti CV et al. Thin-layer test vs. conventional Pap smear. Analysis of 400 split samples . **J.Reprod Med**, 47(1): 9-13, 2002.
10. Tench W. Preliminary assessment of the AutoCyte PREP. Direct-to-vial performance. **J.Reprod Med**, 45(11): 912-916, 2000.
11. Solomon D et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**; 287(16), 2002.
12. Germain M et al. A comparison of the three most common Papanicolaou smear collection techniques. **Obstet Gynecol**; 84: 168-173, 1994.
13. Lee KR et al. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin layer system for cervical cancer screening. **Obstet Gynecol**; 90:278-284, 1997.
14. Bishop JW. Comparison of the CytoRich system with conventional cervical cytology. Preliminary data on 2032 cases from a clinical trial site. **Acta Cytol**; 41: 15-23, 1997.
15. Fagundes MCS et al. Amostra inadequada em Screening cérvico-vaginal. As principais causas. **Laes Haes**; 128, 94-100, 2000.

Recebido em 28/10/2002 ; Aprovado em 29/04/2003