

UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Priscila Paruci

**ACURÁCIA DA METODOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO
AUTOMATIZADA EM RELAÇÃO À METODOLOGIA MANUAL NA
CONFECCÃO DE LÂMINAS DE MATERIAL CERVICO-VAGINAL**

São Paulo

2019

Priscila Paruci

**ACURÁCIA DA METODOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO
AUTOMATIZADA EM RELAÇÃO À METODOLOGIA MANUAL NA
CONFEÇÃO DE LÂMINAS DE MATERIAL CERVICO-VAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da
Universidade Santo Amaro – UNISA,
como exigência para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zonta
Co-orientador: Profa. Dra Carolina Nunes França

São Paulo

2019

P276a Paruci, Priscila

Acurácia da metodologia em meio líquido automatizada em relação à metodologia manual na confecção de lâminas de material cervico-vaginal / Priscila Paruci. – São Paulo, 2019.

62 f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Santo Amaro, 2019.

Orientador(a): Prof. Dr. Marco Antonio Zonta
Coorientadora: Profª. Dra. Carolina Nunes França

1. Citologia em meio líquido. 2. Material cervico-vaginal. 3. Método automatizado. 4. Papanicolaou. I. Zonta, Marco Antonio, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Priscila Paruci

**ACURÁCIA DA METODOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO
AUTOMATIZADA EM RELAÇÃO À METODOLOGIA MANUAL NA
CONFEÇÃO DE LÂMINAS DE MATERIAL CERVICO-VAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Zonta
Co-orientador: Prof. Dra Carolina Nunes França

São Paulo, 26 de fevereiro de 2019

Banca examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Zonta

Profa. Dra Marina Tiemi Shio

Profa Dra. Jenifer Freitas Campos

AGRADECIMENTOS

O meu profundo agradecimento ao meu orientador Prof. Dr Marco Antonio Zonta. Ele que sempre esteve ao meu lado me incentivando a busca pelo conhecimento e orientando o caminho a ser seguido nessa estrada profissional. É um exemplo a ser seguido.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra Carolina Nunes França por todo o ensinamento e ajuda prestada com todo louvor, carinho e destreza.

Agradeço á professora Dra. Yara Juliano e professor Dr. Neil Ferreira Novo por sempre me receber e me ajudar com os dados estatísticos desse trabalho.

Meus agradecimentos á professora Dra. Jane Armond por sempre me passar uma palavra amiga, carinho e incentivo na confecção desse trabalho.

Meus agradecimentos aos componentes da banca examinadora da qualificação, professora Dra. Marina Tiemi e professora Dra. Egle de Campos Costa por fazer parte desse momento importante em minha vida e pelas orientações e sugestões apontadas no trabalho.

Agradeço aos profissionais que atuam no laboratório Multidisciplinar da Universidade Santo Amaro pela ajuda e cooperação na obtenção das imagens ilustradas nesse trabalho.

Agradeço meus colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UNISA.

Agradeço a minha família, meu marido e meus filhos por estarem ao meu lado nesse momento em que almejo um crescimento profissional e intelectual.

Lista de abreviatura

ASCUS	<i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i> (Atipia escamosa de Significado Indeterminado)
CLP	Cellpreserv
CP	Clearprep
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i> (Papilomavirus Humano)
HSIL	<i>High grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo Colunar
LSIL	<i>Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão Escamosa Intraepitelial de Baixo Grau)
OMS	Organização Mundial de Saúde
UMC	<i>Universal Collecting Medium</i>
URC	<i>UNISA Research Center</i>
PAPLAB	Laboratório de Pesquisa e Citodiagnóstico George Nicholas Papanicolaou

Lista de Figuras

Figura 1 - Aparelho Prepstein utilizado na confecção de lâminas DNA-Citolq.....	21
Figura 2 - Confeção de lâmina pela metodologia Thinprep	22
Figura 3 - Equipamentos utilizados na preparação de lâminas na metodologia SurePath	23
Figura 4 - Aparelho para confecção de lâminas da marca CellPreserv.....	24
Figura 5 – Frasco e materiais usados na preparação do meio Clearprep	25
Figura 6 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.....	36
Figura 7 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado CLP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.....	37
Figura 8 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CLP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.....	38
Figura 9 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.....	40
Figura 10 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.....	42
Figura 11 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.....	44
Figura 12 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado e manual CP classificados como alterações benignas e posteriormente lesões suspeito/positivo pelo primeiro observador.....	46
Figura 13 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado e manual CP classificados como alterações benignas e posteriormente lesões suspeito/positivo pelo segundo observador.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Esfregaço de Mulheres preparado por métodos diferentes e analisado pelo primeiro observador de acordo com a adequabilidade da amostra.....	34
Tabela 2 - Esfregaço de Mulheres preparado por métodos diferentes e analisado pelo segundo observador de acordo com a adequabilidade da amostra.....	35
Tabela 3 - Esfregaço de mulheres preservados no meio Clearprep, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.....	36
Tabela 4 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método automatizado e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.....	38
Tabela 5 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.....	39
Tabela 6 - Esfregaço de mulheres preservados no meio Clearprep, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.....	41
Tabela 7 – Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método automatizado e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.....	43
Tabela 8 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.....	45
Tabela 9 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo primeiro observador, segundo os achados morfológicos.	47

Tabela 10 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo segundo observador, segundo os achados morfológicos.....49

Tabela 11 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo primeiro observador, diante dos casos suspeito/positivos.....50

Tabela 12 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo segundo observador, diante dos casos suspeito/positivos.....51

RESUMO

Introdução: Desde a década de 40 foi introduzida uma metodologia para rastreamento do câncer de colo do útero por meio de raspado de células da região cérvico-vaginal com objetivo de identificar precocemente alterações celulares sugestivas da neoplasia, bem como diminuir a incidência do câncer de colo uterino em todo o mundo. É indispensável para a saúde da mulher e saúde pública a melhoria de programas de rastreamento já existentes para esse tipo de neoplasia, bem como a implantação de tecnologias modernas para o diagnóstico precoce e acompanhamento dos novos casos. Com o objetivo de aprimorar esse rastreamento, a citologia em meio líquido vem trazendo vantagens importantes na melhoria da qualidade da confecção das amostras citológicas. O impacto das novas técnicas da citologia, em geral sobre as anormalidades, tem chamado a atenção dos pesquisadores na utilização desse método e no aprimoramento do mesmo. **Objetivo:** avaliar a acurácia da citologia em meio líquido processada manualmente e as amostras processadas pela metodologia automatizada em relação à melhoria da qualidade de amostras para a identificação de alterações citológicas por dois observadores. **Método:** Estudo retrospectivo, observacional, comparativo e qualitativo, constituído por 396 amostras, coletadas de mulheres do presídio feminino da capital, sendo que 202 amostras foram para preparação em método manual e 97 amostras em método automatizado e posteriormente pelo método manual. Após a preparação, as amostras foram coradas pelo método de Papanicolaou e a análise citológica realizada por dois observadores. **Resultados:** Das 396 amostras analisadas pelo primeiro observador, 373 (94,20%) foram satisfatória e 23 (5,80%) insatisfatória. Para o segundo observador, do total de 396 amostras analisadas foram classificadas 367 (92,68%) das amostras como satisfatória e 29 (7,32%) como insatisfatória. A concordância entre os observadores de acordo com a adequabilidade da amostra para os métodos automatizado e manual foi de 97%, mostrando uma boa equivalência entre os observadores. Comparando os achados morfológicos de amostras feitas pelos dois métodos, há concordância de 7 (7,22%) amostras dentro dos limites de normalidade, 57 (58,76%) como alterações benignas e inflamatórias e 1

(1,03%) de lesões suspeito/positivas para o primeiro observador. Para o segundo, 11 (11,34%) amostras foram classificadas em ambos os métodos como dentro dos limites de normalidade, 59 (60,82%) como alterações benignas e Inflamatórias e 2 (2,06%) como lesões suspeito/positivas. Diante desses resultados a porcentagem de concordância entre os métodos ficou em 68,04% para o primeiro observador e 76,29% para o segundo observador. Os resultados obtidos por ambos os observadores apresentaram uma equivalência em ambos os métodos diante dos achados morfológicos e lesões suspeito/positivas. **Conclusão:** Ambos os métodos apresentaram índices equivalentes entre si e de acordo com adequabilidade da amostra. A distribuição celular e ausência de artefatos para ambos os métodos contribuiu para uma melhor qualidade da amostra. Diante dos achados morfológicos, ambos os observadores concordam que o método manual se mostrou tão eficiente quanto o automatizado, mesmo sendo o primeiro observador mais criterioso do que o segundo observador.

ABSTRACT

Since the 1940s, a methodology for cervical cancer screening has been introduced by scraping cells from the cervicovaginal region with the aim of early identification of cell changes suggestive of neoplasia, as well as to reduce the incidence of cervical cancer in the uterus Worldwide. It is essential for the health of women and public health to improve existing screening programs for this type of neoplasia, as well as the implementation of modern technologies for the early diagnosis and follow-up of new cases. In order to improve this screening, the cytology in liquid medium came with important advantages in the improvement of the quality of the cytological samples. The impact of the new techniques of cytology, in general on the abnormalities, has called the attention of the researchers in the use of this method and in the improvement of the same. **Objective:** to evaluate the accuracy of the cytology in manually processed liquid medium and the samples processed by the automated methodology in relation to the quality improvement of cytological samples for the identification of cytological alterations by two observers. **Method:** Retrospective, observational, comparative and qualitative study, consisting of 396 samples, collected from women from the São Paulo female prison, with 202 samples for manual preparation and 97 samples for automated method and later by manual method. After the preparation were stained by the Papanicolaou method and the cytological analysis performed by two observers. **Results:** Of the 396 samples analyzed by the first observer, 373 (94.20%) were satisfactory and 23 (5.80%) were unsatisfactory. For the second observer, of the total of 396 samples analyzed, 367 (92.68%) of the samples were considered as satisfactory and 29 (7.32%) as unsatisfactory. The agreement between the observers according to the suitability of the sample for the automated and manual methods was 97%, demonstrating a good equivalence among the observers. Comparing the morphological findings of samples made by the two methods, there was concordance of 7 (7.22%) samples within the limits of Normality, 57 (58.76%) as Benign and inflammatory Alterations and 1 (1.03%) Suspected Lesions / positive for the first observer. For the second 11 (11.34%) samples were classified in both methods as within the limits of normality, 59

(60.82%) as Benign and Inflammatory Alterations and 2 (2.06%) as Suspected / Positive Lesions. Considering these results, the percentage of agreement between the methods was 68.04% for the first observer and 76.29% for the second observer. The results obtained by both observers presented an equivalent in both methods against morphological findings and suspicious / positive lesions. **Conclusion:** Both methods presented equivalent indices to each other and according to sample suitability. The cellular distribution and absence of artifacts for both methods contributed to a better quality of the sample. In view of the morphological findings, both observers agree that the manual method proved to be as efficient as the automated one, even though the first observer was more judgmental than the second observer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Apresentação	15
1.2 - Fundamentação teórica.....	18
1.2.1 – Início do exame cérvico-vaginal.....	18
1.2.2 – Evolução das técnicas de citologia em meio líquido.....	19
1.2.3 - Meios e técnicas de citologia em meio líquido.....	20
1.2.4 - Sistema Bethesda.....	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MÉTODO	29
3.1 Coleta do material	29
3.2 Preparo das amostras.....	30
3.2.1 Amostras Preservadas em meio ClearPrep.....	30
3.2.2 Amostras Preservadas em meio CellPreserv.....	30
3.2.2.1 Preparo das amostras pelo método automatizado.....	30
3.2.2.1 Preparo das amostras pelo método manual.....	31
3.2.3 Coloração de Papanicolaou.....	32
3.3 Dinâmica do estudo	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	52

6. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Apresentação

O câncer do colo uterino é a quarta neoplasia maligna mais comum entre as mulheres em todo o mundo. No Brasil aparece como o terceiro câncer mais prevalente nas mulheres, sendo superado pelo câncer de mama e colorretal.¹ Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) evidenciam que o número de mortes por essa neoplasia em 2015 atingiu 5.727 casos e a estimativa para 2018 é de 16.370 novos casos, com risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres.²

Nesse contexto torna-se indispensável para a saúde da mulher e saúde pública a melhoria de programas de rastreamento já existentes para esse tipo de neoplasia, bem como a implantação de tecnologias modernas para o diagnóstico precoce e acompanhamento dos novos casos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que mulheres com idade entre 25 a 64 anos, que já iniciaram a atividade sexual, realizem o exame preventivo, permitindo assim a identificação de lesões precursoras e tratamento mais adequado ao câncer de colo uterino.³

A análise da situação epidemiológica do câncer de colo uterino evidencia que a infecção do Papiloma Vírus Humano (HPV) é uma das causas necessária, mas não suficiente para a ocorrência desse tipo de neoplasia. As baixas coberturas no rastreamento e modificações na exposição aos fatores de risco, como início da atividade sexual precoce, tabagismo e múltiplos parceiros, contribuem para infecção pelo HPV e desenvolvimento dessa neoplasia.⁴

No Brasil foi implementado um Plano de Enfrentamento de Doenças Crônicas (2011-2022) que estabeleceu a meta de cobertura do exame de rastreamento do Câncer de colo uterino em 85%.³ Um estudo realizado em 2015 mostrou que a cobertura do rastreamento do câncer de colo uterino no Brasil foi de 85,7%, atingindo as metas nacionais e internacionais.⁵

A estratégia de triagem do Câncer do colo uterino é realizada por meio de uma combinação de metodologias capazes de identificar lesões e o agente causal, o Papilomavírus humano (HPV). A citologia oncótica indicada para o rastreio primário, detecta a presença das alterações celulares pré-malignas e malignas e o teste de identificação de DNA-HPV, identifica seu agente causal, uma grande descoberta para ajudar no prognóstico dessa doença.^{6,7,8}

Desde a década 40, quando George Nicolas Papanicolaou introduziu o rastreio do câncer de colo uterino por meio de raspado de células da região cervico-vaginal, o método vem sendo utilizado com o objetivo de identificar precocemente alterações celulares sugestivas da neoplasia, inclusive em pacientes assintomáticas, bem como diminuir a incidência do câncer de colo uterino em todo o mundo.^{9,7} Porém essa metodologia é questionada, mesmo com a diminuição de casos, quanto a sua sensibilidade em virtude da alta taxa de resultados falso-negativos decorrentes de interferentes como presença de sangue, artefatos de coloração, má fixação do material e má preservação das células, que possam atrapalhar a avaliação do esfregaço e contribuir para os altos índices de insatisfatoriedade das amostras.⁹

Para tentar diminuir os interferentes e obter melhores resultados, a técnica de rastreamento deverá levar em conta o preparo do paciente, a coleta de material celular, preservação e fixação das amostras celulares que são fatores importantes na obtenção da qualidade do material, bem como na identificação de lesões precursoras e neoplasias.¹⁰

Com o objetivo de melhorar a qualidade da amostra, a citologia em meio líquido veio como uma metodologia para padronização e automatização do processo, trazendo vantagens importantes na melhoria da qualidade da confecção das amostras citológicas, quando comparada com a técnica de citologia convencional.¹¹

Aprovada em 1996 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, essa metodologia foi desenvolvida na tentativa de reduzir os interferentes da citologia convencional apresentando um esfregaço mais limpo, sem sobreposição de células e outros elementos que podem prejudicar a observação das amostras.¹²

Assim, esse estudo retrospectivo, observacional, comparativo e qualitativo, verificou a eficácia entre duas técnicas para preparo de amostras celulares coletadas em meio líquido, sendo uma preparada pelo método manual e a outra de forma automatizada, para o processamento de amostras celulares em larga escala, com o objetivo de verificar a qualidade dos esfregaços.

1.2 - Fundamentação teórica

1.2.1 – Início do exame cérvico-vaginal

A citologia oncótica ou citopatologia é uma área da patologia que avalia as alterações celulares de material obtido por escovado, lavado e punção aspirativa de tecidos. Seu principal objetivo é uma análise preliminar das possíveis alterações que possam sugerir algum tipo de processo patológico.¹³

O uso do método citológico para rastreamento de câncer foi introduzido por George Papanicolaou e Aureli Babés em 1928. Em 1943, essa técnica foi aprimorada por Papanicolaou e Traut, que convencionou o seu uso para rastreamento do câncer de colo uterino.^{12, 13}

Desde então essa metodologia é aceita como um bom método, principalmente por ser considerada não invasiva, de produção simples e de baixo custo.¹⁴ Além de ser eficiente na capacidade de identificar lesões precursoras do câncer cervical em sua fase inicial, facilitando assim o tratamento.¹⁵

Essa metodologia de rastreamento tem início em um tempo no qual o câncer cervical apresentava altíssimas taxas de mortalidade em mulheres em todo o mundo e as lesões precursoras eram de difícil detecção ao exame clínico, principalmente por serem assintomáticas e indetectáveis clinicamente. Quando o rastreamento passou a ser amplamente utilizado, estudos mostraram uma queda significativa nos níveis de mortalidade entre as mulheres.¹⁶

Desde 1996 têm sido desenvolvidos sistemas de preparo de amostras citológicas conservadas em meio líquido, como uma importante contribuição para melhorar a sensibilidade do exame citológico cérvico-vaginal. A qualidade da preservação, a fixação do material celular e a homogeneidade da distribuição celular no esfregaço são os principais fatores que influenciaram a melhoria da sensibilidade.¹⁷

1.2.2 – Evolução das técnicas de citologia em meio liquido

Na década de 1990 desenvolveu-se um método de conservação e preparo de amostras para a melhoria da qualidade e a padronização dos exames citológicos no rastreamento do Câncer de colo uterino. A citologia em meio liquido mostrou ser eficaz e sensível em relação á citologia convencional na identificação de lesões precursoras do câncer de colo uterino.¹⁸

Estudos comparando a qualidade das amostras e o diagnóstico citológico pelos métodos convencional e em meio liquido, mostraram um considerável aumento na identificação de alterações celulares encontradas nas amostras em meio liquido em comparação com as amostras convencionais, demonstrando inclusive maior detecção de lesões intraepiteliais nas amostras em meio liquido quando comparada as amostras convencionais.¹⁹

Mesmo assim a citologia em meio líquido não é apresentada como substituta do método convencional, mas sim, como um aprimoramento da técnica e evolução do teste para rastreamento do câncer de colo do útero.¹⁷

Esse método tem como princípio a fixação de células em monocamada, evitando sobreposição do material, facilitando assim, a identificação das alterações celulares ao microscópio óptico. A técnica permite uma diminuição de esfregaços classificados como insatisfatórios, reduzindo a quantidade de interferentes na lâmina.¹⁸

A padronização da amostra pela citologia em meio liquido possibilitou a automação do processo de leitura das amostras.¹⁹

A preservação desse material permite ainda, a utilização de outras metodologias para identificação de material genômico de agentes biológicos e biomarcadores. A associação das duas metodologias vem ganhando espaço nos programas de rastreamento do câncer do colo uterino.^{15,19}

Na análise do material celular por microscopia óptica faz-se necessário um treinamento dos profissionais que farão a análise do material para qualificar as amostras ao microscópio.¹⁷

Uma das maiores desvantagens da metodologia em meio líquido é o alto custo do processo automatizado e do equipamento utilizado na confecção das amostras, bem como a manutenção dos mesmos e a necessidade de treinamento de profissional para a leitura do material em microscópio ótico.¹²

O impacto das novas técnicas da citologia, em geral sobre as anormalidades, tem chamado a atenção dos pesquisadores para a utilização dessa técnica e aprimoramento da mesma.¹⁹

1.2.3 - Meios e técnicas de citologia em meio líquido

Em 2002, a citologia em meio líquido e as técnicas envolvidas foram introduzidas no Brasil pela empresa Digene. Essa técnica, desenvolvida nos Estados Unidos, promovia a melhoria da qualidade dos esfregaços citológicos, chamada de DNA-citoliq.²⁰

Essa técnica era composta por frasco contendo uma solução de preservação do material celular, denominado de Meio de Coleta Universal (do inglês, UMC – *Universal Collecting Medium*), com o objetivo de melhorar a qualidade do esfregaço, diminuindo a quantidade de artefatos como restos celulares, hemorragia e infiltrado inflamatório que interferiam diretamente na confecção de lâminas.²⁰

O material celular coletado por uma escova de cerdas plásticas era totalmente acondicionado no líquido junto com a escova. O preparo das amostras era feito com o desprendimento das células das cerdas da escova por agitação por vórtex, centrifugação e transferência do *pellet* celular para um filtro, denominado filtrogene, fixado a um equipamento manual chamado de prepegene.²¹ (figura 1)

Figura 1 - Aparelho Prepegene utilizado na confecção de lâminas DNA-Citoliq. (A: Filtrogene (membrana de policarbonato) e conjunto de lâminas. B:

Preparação semi automatizada, deposição de material sobre o filtrogene. C: Travamento do equipamento para transferência do material para a lâmina.)



Fonte: Filho, LA. 2005.²¹

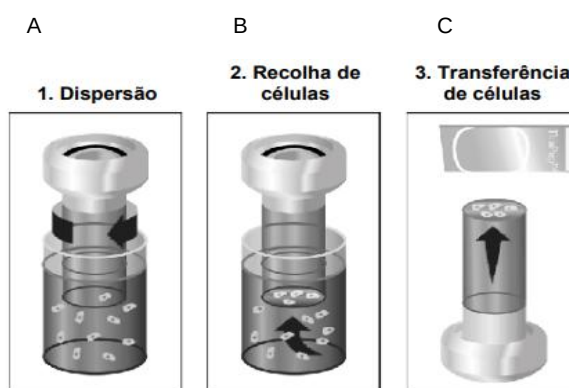
O líquido centrifugado contendo as células em suspensão era transferido manual e uniformemente para uma membrana plástica. Após todas as amostras transferidas para o filtro realizava-se um *imprint* do material nas lâminas de vidro carregadas com carga negativa. Em seguida o material fixado era submetido à coloração de Papanicolaou convencional.²¹

Outras técnicas acompanharam a evolução para meio líquido, sendo as duas mais utilizadas atualmente: a técnica de Thinprep e SurePath.

A técnica do Thinprep utiliza uma escova Cervex-Brush para coleta do material cérvico-vaginal. Após a coleta o material é lavado no líquido conservante e o preparo da lâmina é feito pelo método automatizado.²¹

Para confecção de lâmina usando o meio Thinprep o aparelho automatizado realiza uma agitação do frasco por meio de sistema de centrifugação. O aparelho apresenta um sistema de filtro que promove a passagem de substâncias inadequadas e a retenção de células em sua base. A sucção é feita à vácuo. Em seguida, o sistema promove uma rotação e realiza um *imprint* na lâmina.^{22,23} (figura 2)

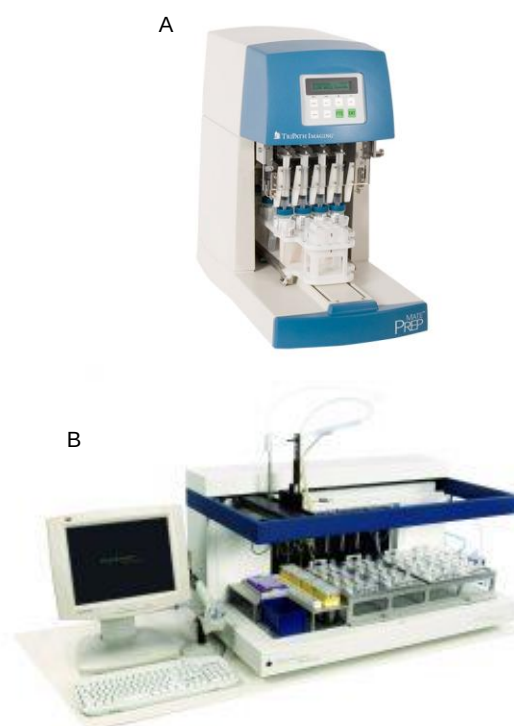
Figura 2 - Confeccao de lâmina pela metodologia Thinprep. (A. agitação do material por rotação do cilindro que contém o filtro. B. Sucção do material e deposição de células no filtro. C. Rotação de 180° e imprint na lâmina posicionada paralela ao frasco.)



Fonte: https://www.hologic.com/sites/default/files/2018-05/MAN-02203-602_003_02.pdf²⁴

A técnica de Surepath utiliza-se também de uma escova Cervex-Brush, porém a cabeça da escova se destaca do pincel e fica imersa no meio conservante. O preparo da lâmina também é realizado pelo método automatizado, porém com a utilização de vários equipamentos para a conservação do material, desprendimento das células, deposição de interferentes e transferência do material para a lâmina. O material coletado pelo método Surepath sofre uma agitação e centrifugação, porém o uso de substâncias de diferentes gradientes de densidade é que ajuda na separação de células e artefato possíveis. Em seguida é levado para outro equipamento em que acontece a sucção, deposição e fixação do material da amostra na lâmina, tudo pelo método automatizado.²² (Figura 3)

Figura 3 - Equipamentos utilizados na preparação de lâminas na metodologia SurePath. (A. Aparelho BD Surepath Prepmate, utilizado na preparação com o líquido de diferentes densidade; B. Aparelho BD Surepath Prep Stain, utilizado para confecção de lâmina e coloração)



Fonte: <http://diagnocel.com.br/diagnostico-in-vitro/bd-surepath-prepmate/>.²⁵

A partir dessas duas técnicas, SurePath e Thinprep, outras técnicas estão sendo desenvolvidas, a maioria com base no mesmo princípio da técnica do Thinprep. Exemplo disso são as técnicas Cellpreserv da marca KolplastTM e Clearprep (Resolution Biomedical, Inc., Tusctin, CA).²⁶

A coleta do material em meio líquido da marca CellPreservTM (CP) é realizada utilizando uma escova de cerdas plásticas com ponta protegida. Após a coleta, o material é processado no equipamento denominado Processador de lâminas. Esse equipamento homogeneiza o material, promovendo uma agitação do líquido e a separação de células e restos celulares presentes na amostra.

Por sucção, pequenas partículas como restos celulares e hemácias ultrapassam o filtro e as células são depositadas na membrana presente em uma das porções do cilindro que age como delimitador e participa do processo de preparação da lâmina. O cilindro promove uma rotação e a membrana permite o *imprint* de uma única camada celular na lâmina.²⁷

Figura 4 - Aparelho para confecção de lâminas da marca Cell Preserv.

(processador de lâmina CellPreserv)



Fonte: <http://www.kolplast.com.br/portfolio/cellpreserv/>²⁷

As amostras preservadas no meio Clearprep são preparadas manualmente. Após a coleta com uma espátula o material é lavado no líquido de preservação. Em laboratório os frascos passam por uma agitação em vórtex por 10 segundos. Uma alíquota do material é transferida para um tubo que será levado para a centrifugação por 5 minutos a 2.000rpm. Após a centrifugação descarta-se o sobrenadante e ao material restante é adicionada uma quantidade de Clearprep Cytology Solution que ajuda na preservação e fixação do material na lâmina específica do fabricante.²⁶ (figura 5)

Figura 5 – Frasco e materiais usados na preparação do meio Clearprep

(A. Escova e frasco para método Clearprep. B. Clearprep Cytology Solution, frasco contendo o líquido de preservação e fixação das células)



Fonte: <http://www.resolutionbiomedical.com/whyclearprep/> ²⁶

1.2.4 - Sistema Bethesda

Muitas foram as classificações propostas para o exame de citologia cérvico-vaginal, desde Papanicolaou na década de 40, que classificava os esfregaços de acordo com o grau da lesão, até no ano de 2001 com a criação do Sistema Bethesda.¹⁴

A classificação proposta por Papanicolaou em 1943 descrevia os achados do esfregaço em classes, onde classe I estava relacionada com ausências de células atípicas ou anômalas, classe II com atipias citológicas, porém sem evidências de malignidade, classe III e classe IV abrangem citologia sugestiva e fortemente suspeita, respectivamente, e classe V relacionada com malignidade.¹⁴

Em 1953 Reagan *et al* descreveram as alterações citológicas relacionadas às histológicas classificando as lesões suspeitas e sugestivas como displasias graduadas em leve, moderada e severa. Em 1967 Richart propôs que as lesões poderiam evoluir para o Câncer escamoso invasivo e classificou os esfregaços atípicos como neoplasias intra-epiteliais de grau I, II e III.¹⁴

Atualmente as amostras cérvico-vaginais são classificadas utilizando-se o Sistema Bethesda, atualizado em 2018, classificando as amostras a partir da qualidade do material até as alterações citomorfológicas encontradas.^{14,29} (quadro 1).

Com relação à adequabilidade da amostra foi estipulado um sistema binário que melhor caracteriza a condição da amostra na lâmina, classificando como Insatisfatório e Satisfatório.²⁹

Os critérios para classificar um esfregaço como insatisfatórios são: esfregaço acelular ou hipocelular (contendo menos de 5.000 células no esfregaço), leitura prejudicada por interferentes com mais de 75% de presença de sangue no esfregaço, restos celulares, leucócitos, artefato de dessecação e/ou sobreposição celular.²⁹

A qualidade da amostra Satisfatória é definida pela representação da zona de transformação, do epitélio escamoso e do epitélio endocervical.¹¹ Isso é de grande importância, pois visa manter a viabilidade da amostra, identificando células da região de início do processo de oncogênese cervical.^{17,29}

As lesões suspeitas podem ser classificadas como: Lesão Escamosa Intraepitelial de baixo Grau (LSIL), as quais apresentam alteração nuclear denominada discariose em células maduras do colo uterino, Lesão Escamosa Intraepitelial de Alto Grau (HSIL) com a presença de alteração nuclear discariose moderada a severa em células imaturas, comprometendo todas as

camadas do epitélio, Atipia Escamosa de Significado Indeterminado (ASCUS) destinada àquelas situações onde não há clareza nas alterações nucleares evidenciadas no esfregaço.²⁹

Quadro 1: Comparação entre as classificações citológicas.^{28,30}

PAPANICOLAOU (1943)	REAGAN (1953)	RICHART (1973)	SISTEMA BETHESDA (1988, 1991 e 2001)
CLASSE I – dentro da normalidade	Citologia normal	Citologia Normal	Dentro dos Limites de Normalidade
CLASSE II – reações inflamatórias	Citologia inflamatória	Citologia Inflamatória	Alterações Benignas/ Negativo para lesões e malignidade
			ASCUS
CLASSE III – sugestivo porém não conclusivo	Displasia Leve	NIC I	LSIL
	Displasia Moderada	NIC II	HSIL
	Displasia Severa	NIC III	HSIL
CLASSE IV – altamente sugestivo	Carcinoma <i>in situ</i>		ASC-H
CLASSE V - maligno	Carcinoma	Carcinoma	Carcinoma Escamoso
	Escamoso Invasor	Escamoso Invasor	Invasor

Fonte: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Nomenclatura_Internet.pdf³⁰

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a acurácia da citologia em meio líquido de amostras processadas manualmente e pelo método automatizado em relação à qualidade de amostras citológicas para a identificação de alterações citológicas por dois observadores.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade das células processadas manual e automaticamente.
- Avaliar a acurácia das metodologias na identificação de alterações celulares benignas, suspeitas e positivas para malignidade.

3. MÉTODOS

Estudo retrospectivo, observacional, comparativo e qualitativo, constituído por 396 amostras, coletadas de mulheres do presídio feminino da capital na faixa etária entre 18 a 65 anos, não gestantes, que por iniciativa própria aceitaram realizar o exame preventivo para o câncer de colo uterino.

O projeto é um apêndice do estudo intitulado **Ocorrência de lesões precursoras do câncer de colo uterino e infecção pelo HPV nas mulheres internas no presídio feminino da cidade de SP**, após 15 anos da primeira avaliação, aprovado pelo comitê de ética da Universidade Santo Amaro (CAEE: 53041216.0.0000.0081). As mulheres foram submetidas a uma anamnese de carácter sócio-epidemiológico, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. As mulheres que se recusaram a participar do projeto, não foram incluídas na amostragem do presente trabalho.

3.1 Coleta do material

As primeiras 299 amostras cérvico-vaginais foram coletadas em meios líquidos distintos para preparação de lâminas em dois métodos diferentes, manual e automatizado (máquina), sendo que 202 amostras foram para preparação em método manual e 97 amostras em método Automatizado.

As 202 amostras celulares para o método manual foram coletadas por raspado das regiões de ectocervical, junção escamo-colunar (JEC) e canal endocervical do colo uterino foram adquiridas por um escovado utilizando-se uma escova de cerdas plásticas em uma rotação de 360° e armazenadas em meio líquido da marca Clearpreap™ (CP) e 97 amostras cervicais foram coletadas utilizando-se o mesmo procedimento e da mesma região anatômica, preservadas em meio celular Cellpreserv™ (CLP) para processamento automático e manual.

3.2 Preparo das amostras

O preparo das amostras, coloração de Papanicolaou e a leitura das lâminas foram realizadas no PAPLAB, laboratório de pesquisa em citopatologia do Centro de Pesquisa da Universidade Santo Amaro (URC – UNISA RESEARCH CENTER).

3.2.1 Amostras Preservadas em meio ClearPrep

As amostras preservadas no meio (CP) foram homogeneizadas manualmente e depois centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL da solução própria do método.

Uma gota da amostra foi pipetada sobre uma lâmina de vidro, específica do Kit, marcada com carga elétrica positiva para melhor fixação celular na base de vidro. Uma gota de 50 µL de álcool isopropílico foi adicionada ao material para acelerar o processo de fixação celular.

As lâminas foram posicionadas em estante de ferro e mantidas por uma hora em álcool etílico 95% para fixação definitiva do material celular e após esse período as lâminas foram submetidas à coloração de Papanicolaou convencional.

3.2.2 Amostras Preservadas em meio CellPreserv

As 97 amostras celulares preservadas em meio CLP foram processadas de duas maneiras diferentes: automaticamente e manualmente.

3.2.2.1 Preparo das amostras pelo método automatizado

O preparo automatizado foi realizado no equipamento KLP 2000 da empresa Kolplast™.

Ao frasco inserido na rack do equipamento é introduzido um cilindro que apresenta em uma das extremidades um filtro. O equipamento promove uma agitação por turbilhão do material celular, o qual é suspenso e fixado por uma membrana de sílica posicionada no cilindro descartável, em seguida, o material é transferido por *imprint*, para a lâmina posicionada em paralelo à membrana.

O material celular é direcionado por um funil de plástico e concentrado no centro da membrana que delimita a transferência organizada para a lâmina carregada com carga elétrica positiva.

Esse procedimento levou cerca de 2 minutos e 30 segundos para cada lâmina processada nesse equipamento. O tempo total de preparo das 97 amostras foi de 14.550 segundos, aproximadamente 4 horas.

As lâminas foram transferidas para um suporte de lâminas e o material celular foi fixado em álcool 95%. O material foi submetido ao método de coloração de Papanicolaou convencional.

3.2.2.1 Preparo das amostras pelo método manual

Para verificar a eficácia no preparo do material citológico pelo método automatizado em relação ao manual, as 97 amostras cervicais preservadas no meio líquido CLP e preparadas pelo método automatizado foram também processadas manualmente.

Todas as 97 amostras celulares obedeceram à mesma metodologia utilizada no processamento das 202 amostras iniciais até o procedimento de coloração.

As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso na própria solução. Uma alíquota do material foi transferida para uma lâmina estéril e feita uma distribuição sobre toda a lâmina.

Para melhor fixação do material foi adicionada sobre a lâmina uma gota de álcool 95% e após secagem ao ar as mesmas foram colocadas em um suporte de ferro e encaminhadas para coloração de Papanicolaou.

O preparo de todas as 97 amostras pelo método manual levou 4 horas até a coloração.

3.2.3 Coloração de Papanicolaou

Os materiais utilizados na coloração de Papanicolaou são: Corante nuclear (Hematoxilina de Harris), Corantes citoplasmáticos (Orange G e Eosina Alcoólica 36), quantidades de álcool em concentrações diferentes (absoluto, 95%, 70% e 50%), água ácida (ácido clorídrico a 0,2% - 400ml de álcool 50% + 2ml de ácido clorídrico) Xilol, Balsamo e Lamínula.

O suporte de ferro contendo as lâminas é mergulhado 45 vezes em cada cuba contendo álcool na sequência 95%, 70%, 50%. O suporte é então mergulhado por 4 minutos em uma cuba contendo corante Hematoxilina de Harris. Depois de passado o tempo retira-se o suporte dessa cuba e realiza-se um único mergulho na cuba que contém água ácida e em seguida é lavada em água corrente por cerca de 5 minutos.

O suporte então segue mais 45 mergulhos em nova sequência de álcool 50%, 70% e 95%. Ao término coloca-se em uma cuba contendo o corante Orange G por 3 minutos. Passado o tempo lava-se o suporte com as lâminas em duas cubas contendo álcool 95%, a lavagem é realizado por meio de 45 mergulhos em cada cuba. O suporte passa então para a cuba contendo Eosina alcoólica 36 (EA36) permanecendo ali por mais 3 minutos. Após o tempo o suporte é lavado mais duas cubas contendo álcool 95% por meio de mergulhos. Para finalizar, o suporte permanece por 2 minutos mergulhado em duas cubas de álcool absoluto e depois permanece por 10 minutos em uma cuba contendo Xilol.

As lâminas são então cobertas uma a uma por bálsamo e lamínula.

3.3 Dinâmica do estudo

A análise citológica e a leitura foram realizadas por microscopia ótica por dois citologistas de tempos de experiência profissional diferentes e seguiram os procedimentos padronizados no PAPLAB localizado no Centro de Pesquisa da Universidade Santo Amaro (UNISA RESEARCH CENTER).

Ambos os observadores utilizaram o mesmo microscópio para a análise dos materiais. O equipamento utilizado foi da marca Nikon Eclipse E200.

As amostras foram classificadas conforme o Sistema Bethesda 2001.

A análise citológica contemplou as seguintes variáveis para análise: distribuição e preservação celular em lâmina, a satisfatoriedade da amostra para análise citopatológica e identificação de critérios de lesões celulares diferenciando-se a qualidade nos dois métodos.

Foram considerados esfregaços satisfatórios amostras que apresentaram representação celular das camadas escamosa, JEC e endocervical, escamosa e JEC ou apenas escamosa.

Quanto à identificação da morfologia e alterações celulares, seguimos o seguinte padrão: características citomorfológicas compatíveis com padrão de normalidade, alterações celulares benignas (características celulares reativas) e Lesões Suspeito/Positivo que englobam as atipias de significado indeterminado, lesão de baixo grau e lesão de alto grau.

Para a análise estatística dos resultados foi aplicado o teste Kappa de concordância para estudar as leituras entre o 1º e 2º observador bem como a metodologia de confecção do material (manual e automatizado). ³¹ Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de significância.

4. RESULTADOS

Do total de 396 amostras classificadas pelo primeiro observador quanto à adequabilidade da amostra, 373(94,20%) foram classificadas como Satisfatória e 23 (5,80%) amostras classificadas como Insatisfatória. Entre as 202 amostras preservadas pelo meio Clearpreap (CP) e confeccionadas pelo método manual, 190 (94,06%) foram classificadas como satisfatória e 12 (5,94%) como Insatisfatória. Ao analisar as 97 amostras preservadas no meio CellPreserv e confeccionadas pelo método automatizado, o primeiro observador classificou 90 (92,78%) amostras como satisfatório e 7 (7,22%) amostras como Insatisfatório. Para o método manual das amostras preservadas no meio CellPreserv, foi classificado 93 (95,88%) amostras como satisfatório e 4 (4,12%) como Insatisfatório (tabela 1)

Tabela 1 - Esfregaço de Mulheres preparado por métodos diferentes e analisado pelo primeiro observador de acordo com a adequabilidade da amostra.

	Satisfatório	Insatisfatório	Total
Manual	190 94,06%	12 5,94%	202 100%
Automatizado	90 92,78%	7 7,22%	97 100%
Manual Refeito	93 95,88%	4 4,12%	97 100%
Total	373 94,20%	23 5,80%	396 100%

Para o segundo observador, do total de 396 amostras analisadas, foram classificadas 367 (92,68%) das amostras como satisfatória e 29 (7,32%) como Insatisfatória. Das 202 amostras preservadas no meio Clearprep e preparadas pelo método manual, foram classificadas 184(91,09%) amostras como satisfatória e 18 (8,91%) como insatisfatória. Das 97 amostras preservadas no meio CellPreserv e preparadas pelo método automatizado 89 (91,75%), foram classificadas como satisfatória e 8 (8,25%) como insatisfatória.

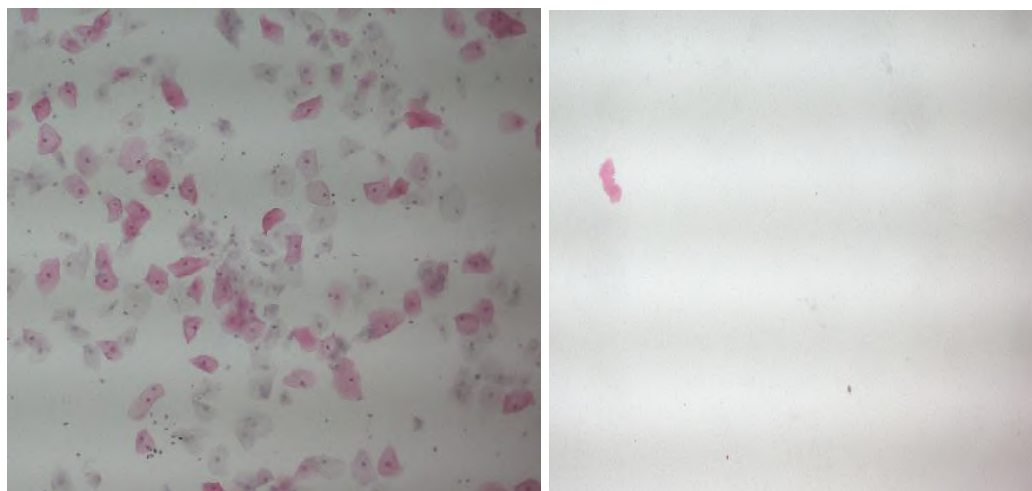
Quando essas amostras foram preparadas pelo método manual o segundo observador classificou 94 (96,91%) das amostras como satisfatória e 3 (3,09%) como insatisfatória. (tabela 2)

Tabela 2 - Esfregaço de Mulheres preparado por métodos diferentes e analisado pelo segundo observador de acordo com a adequabilidade da amostra.

	Satisfatório	Insatisfatório	Total
Manual	184 91,09%	18 8,91%	202 100%
Automatizado	89 91,75%	8 8,25%	97 100%
Manual Refeito	94 96,91%	3 3,09%	97 100%
Total	367 92,68%	29 7,32%	396 100%

Os resultados comparativos entre os dois observadores estão representados nas tabelas seguintes. A tabela 3 mostra os resultados encontrados na observação de lâminas preservadas em meio Clearprep e preparadas pelo método manual. Das 202 amostras, 184 (91,00%) foram classificadas como satisfatória e 12 (5,94%) como insatisfatória por ambos os observadores, apresentando uma porcentagem de concordância entre os observadores de 97,03%. (figura 6)

Figura 6 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 25 (satisfatória) e Lâmina 01 (insatisfatória). Aumento 100x .

As amostras discordantes foram 6 (2,97%), classificadas como satisfatório pelo primeiro observador e insatisfatório pelo segundo observador. (tabela3)

Tabela 3 – Esfregaço de mulheres preservados no meio Clearprep, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.

1º observador \ 2º observador	1º observador		Total
	Satisfatório	Insatisfatório	
Satisfatório	184 91,00%	0	184 91,00%
Insatisfatório	6 2,97%	12 5,94%	18 8,91%
Total	190 94,06%	12 5,94%	202 100%

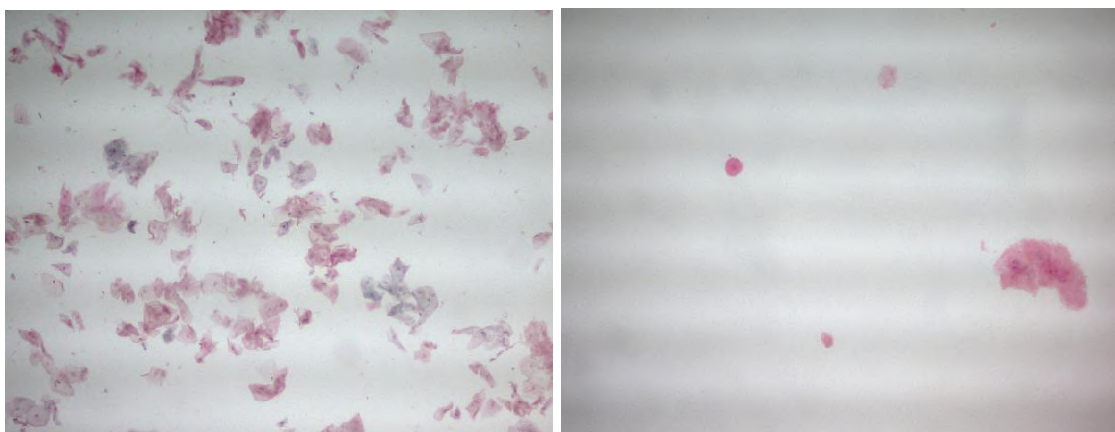
Teste Kappa

K= 0,7846; z= 11,42 (p<0,0001)

Concordância: 97,03%

A tabela 4 representa a mesma avaliação de dois observadores de acordo com a Adequabilidade das amostras preservadas em meio CellPreserv e preparadas pelo método automatizado. Das 97 amostras preparadas, 89 (91,75%) foram concordantes como satisfatório e 7 (7,21%) amostras classificadas como insatisfatório para ambos os observadores e 1 (1,04%) amostra apresentou discordância, sendo classificada como satisfatória para o primeiro observador e insatisfatória para o segundo. (figura 7)

Figura 7 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado CLP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 227 (satisfatória) e Lâmina 214 (insatisfatório). Aumento 100x .

A porcentagem de concordância entre os observadores foi de 99,00%.
(tabela4)

Tabela 4 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método automatizado e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.

1o observador 2o observador	Satisfatório	Insatisfatório	Total
Satisfatório	89 91,75%	0	89 91,75%
Insatisfatório	1 1,04%	7 7,21%	8 8,25
Total	90 92,78%	7 7,21%	97 100%

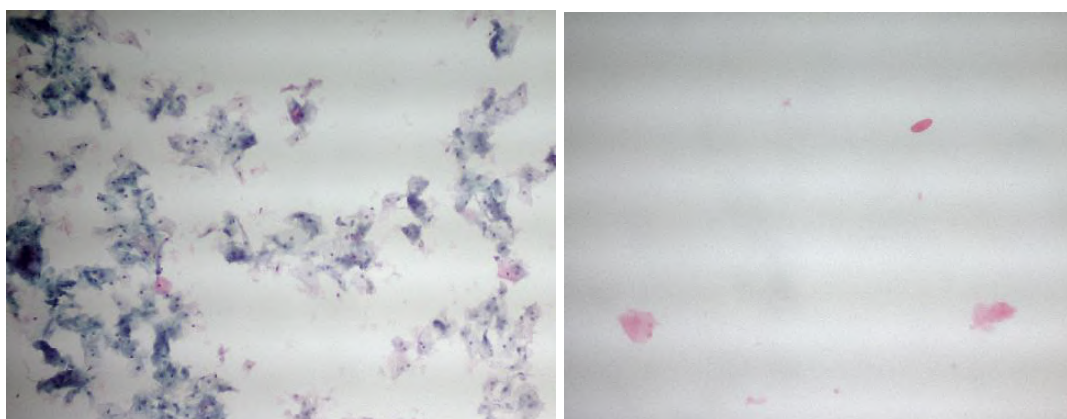
Teste Kappa

K= 0,9897; z= 9,16 (p<0,0001)

Concordância: 99,00%

Das amostras preservadas em meio Cellpreserv e preparadas pelo método manual, resultados mostrados na tabela 5, houve concordância em 92 (94,84%) amostras entre ambos os observadores para uma classificação de esfregaço satisfatório e 2 amostras (2,06%) como insatisfatório, o que mostra uma porcentagem de concordância entre os observadores de 97,00%. (figura 8)

Figura 8 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CLP e classificada por ambos os observadores como Satisfatório e Insatisfatório, respectivamente.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 227 (satisfatória) e Lâmina 234 (insatisfatório). Aumento 100x .

O primeiro observador classificou 2 (2,06%) amostras como insatisfatório e o segundo observador como satisfatório e 1 (1,03%) amostra classificada como insatisfatório para o segundo observador foi classificada como satisfatória para o primeiro observador. (tabela 5)

Tabela 5: Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo a adequabilidade da amostra.

2o observador \ 1º observador	Satisfatório	Insatisfatório	Total
Satisfatório	92 94,84%	2 2,06%	94 96,91%
Insatisfatório	1 1,03%	2 2,06%	3 3,09%
Total	93 95,88%	4 4,12%	97 100%

Teste Kappa

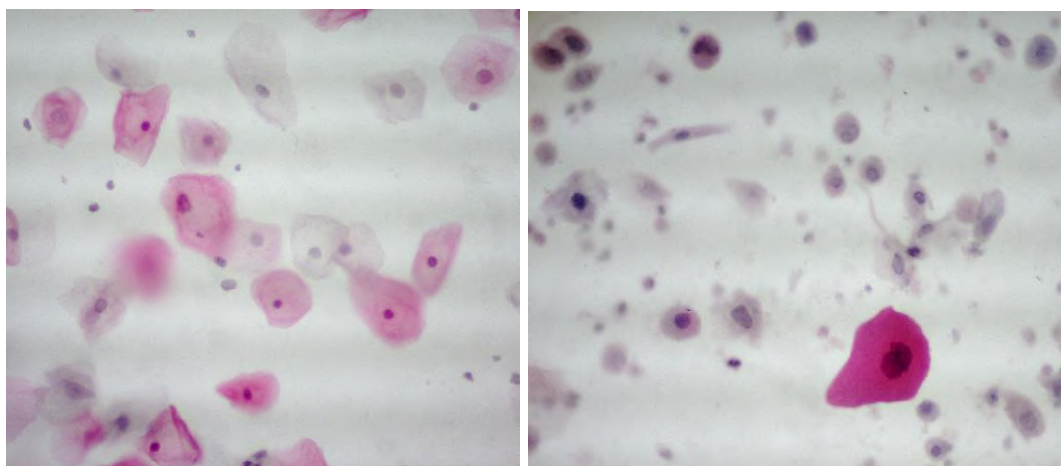
K= 0,5557; z= 5,53 (p<0,0001)

Concordância : 97,00 %

Os resultados descritos nas tabelas 6 e 7 a seguir referem-se a uma comparação entre dois observadores quanto ao diagnóstico final de cada amostra.

Na tabela 6 são mostrados os resultados obtidos com amostras preservadas em meio Clearprep e preparadas pelo método manual. A concordância entre os observadores é de 83,66%, sendo que 12 (5,94%) amostras foram classificadas como insatisfatória, 24 (11,88%) amostras foram classificadas por ambos como dentro dos limites de normalidade, 121 (59,90%) como alterações celulares Benignas compatíveis com processo inflamatório inespecífico ou específico (com a presença de agentes etiológicos conhecidos) e 12 (5,94%) como Lesões Suspeitas/Positivas que abrangem Lesões de Baixo Grau (LSIL), Lesões de Alto Grau (HSIL), Atipias escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS). (figura 9)

Figura 9 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 25 (LSIL) e Lâmina 80 (HSIL). Aumento 400x .

Para o primeiro observador foi classificado 27 (13,37%) das amostras como dentro dos limites de normalidade, 149 (73,76%) alterações benignas e inflamatórias, 14 (6,93%) como lesões suspeito/positivo. Para o segundo observador foi 45 (22,28%) como dentro dos limites de normalidade, 125 (61,88%) como alterações Benignas e inflamatórias e 14 (6,93%) de lesões suspeitas/positivas. (tabela 6)

Tabela 6 - Esfregaço de mulheres preservados no meio Clearprep, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.

1º observador 2º observador					
	Insatisfatório	Dentro dos limites de normalidade	Alterações Benignas	Lesões Suspeito/positivas	Total
Insatisfatório	12 5,94%	1 0,49%	5 2,47%	0	18 8,91%
Dentro dos limites de normalidade	0	24 11,88%	21 10,40%	0	45 22,28%
Alterações Benignas	0	2 0,99%	121 59,90%	2 0,99%	125 61,88%
Lesões Suspeito/positivas	0	0	2 0,99%	12 5,94%	14 6,93%
Total	12 5,94%	27 13,37%	149 73,76%	14 6,93%	202 100%

Teste Kappa

K= 0,84; z= 11,42 (p<0,0001)

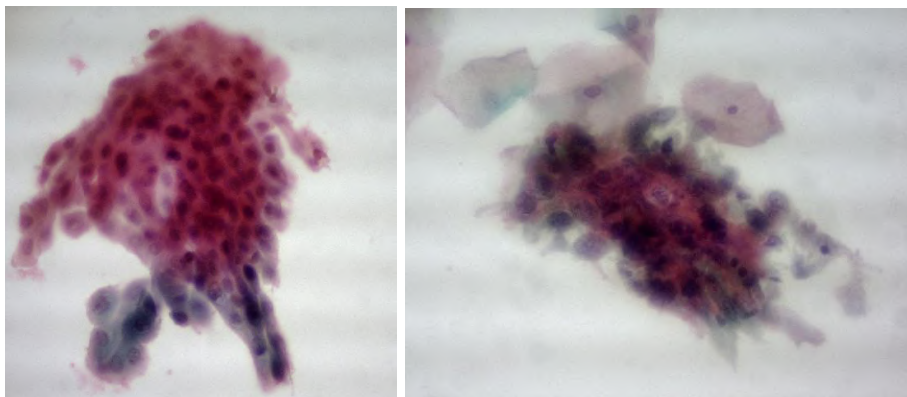
% de concordância = 83,66%

% acima da diagonal = 14,36%

% abaixo da diagonal = 4,12%

Na tabela 7 estão descritos os resultados comparativos entre os dois observadores na leitura de amostras preservadas em meio Cellpreserv e confeccionadas pelo método automatizado. Nesse caso a concordância entre os observadores é de 88,66%. Os resultados encontrados por ambos foi de 7 (7,21%) amostras insatisfatória, 9 amostras (9,28%) dentro dos limites de normalidade, 68 (70,10%) de alterações benignas/inflamatórias, 2 (2,06%) de lesões suspeitas/positivas.

Figura 10 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 279 automatizado (HSIL) e Lâmina 211 automatizado (HSIL). Aumento 400x .

Quando verificado os resultados do primeiro observador temos 10 amostras (10,31%) classificadas como dentro dos limites de normalidade, 77 (79,38%) como Alterações Benignas e inflamatórias e 3 amostras (3,09%) como Lesões suspeitas/positivas. Para o segundo observador foram classificadas 17 amostras (17,52%) dentro dos limites de normalidade, 70 amostras (72,16%) como alterações Benignas e inflamatórias e 2 como Lesões suspeitas/positivas.

Tabela 7 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método automatizado e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.

1º observador 2o observador	Insatisfatório	Dentro dos limites de normalidade	Alterações Benignas	Lesões Suspeito/positivas	Total
Insatisfatório	7 7,21%	0	1 1,03%	0	8 8,25%
Dentro dos limites de normalidade	0	9 9,28%	8 8,25%	0	17 17,52%
Alterações Benignas	0	1 1,03%	68 70,10%	1 1,03%	70 72,16%
Lesões Suspeito/positivas	0	0	0	2 2,06%	2 2,06%
Total	7 7,21%	10 10,31%	77 79,38%	3 3,09%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,8218; z= 5,76 (p<0,0001)

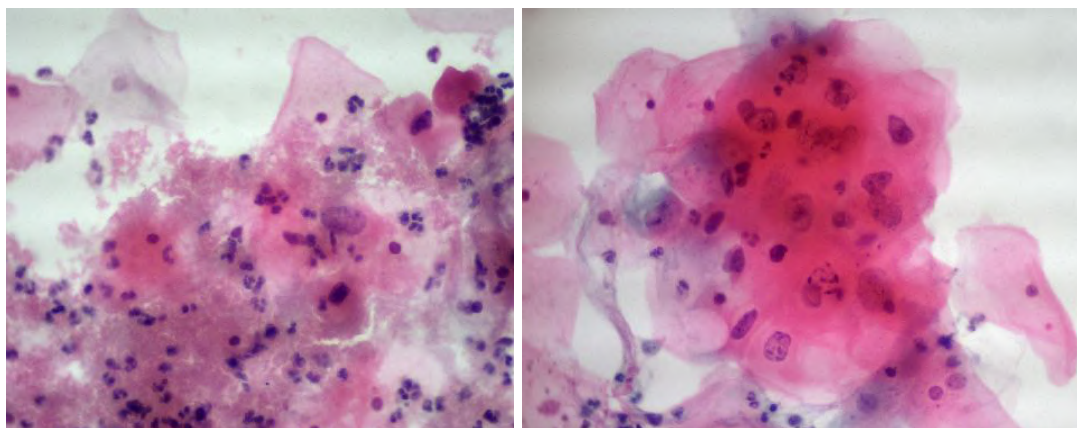
% de concordância = 88,66%

% acima da diagonal = 9,28%

% abaixo da diagonal = 1,03%

Na tabela 8 estão os resultados encontrados pelos dois observadores ao analisar as amostras preservadas em meio CellPreserv e preparadas pelo método manual. Nesse caso houve uma concordância de 73,20% entre os observadores. Sendo que 2 (2,06%) amostras foram classificadas por ambos como insatisfatória, 11 (11,34%) classificadas como Dentro dos limites de Normalidade, 53(54,64%) classificadas como Alterações Benignas e Inflamatórias e 5(5,15%) das amostras classificadas como Lesões suspeitas/positivas.

Figura 11 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método manual CP e classificada por ambos os observadores como lesões suspeito/positivo.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 214 manual (LSIL) e Lâmina 211 manual (HSIL). Aumento 400x .

Quando verificamos as classificações individualizadas temos que o primeiro observador classificou 14 (14,43%) das amostras como Dentro dos limites de normalidade, 64 (65,98%) como Alterações Benignas e inflamatórias e 15 como Lesões Suspeitas/positivas. O segundo observador classificou 19 (19,59%) das amostras como Dentro dos limites de normalidade, 68 (70,10%) como Alterações Benignas e inflamatórias e 7 (7,22%) como Lesões Suspeitas/positivas.

Tabela 8 - Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e analisado por 2 observadores, segundo os achados morfológicos.

1º observador 2º observador	Insatisfatório	Dentro dos limites de normalidade	Alterações Benignas	Lesões Suspeito/positivas	Total
Insatisfatório	2 2,06%	0	1 1,03%	0	3 3,09%
Dentro dos limites de normalidade	0	11 11,34%	8 8,25%	0	19 19,59%
Alterações Benignas	2 2,06%	3 3,09%	53 54,64%	10 10,31%	68 70,10%
Lesões Suspeito/Positivas	0	0	2 2,06%	5 5,15%	7 7,22%
Total	4 4,12%	14 14,43%	64 65,98%	15 15,46%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,547; z= 3,05 (p<0,0001)

% de concordância = 73,20%

% acima da diagonal = 19,59%

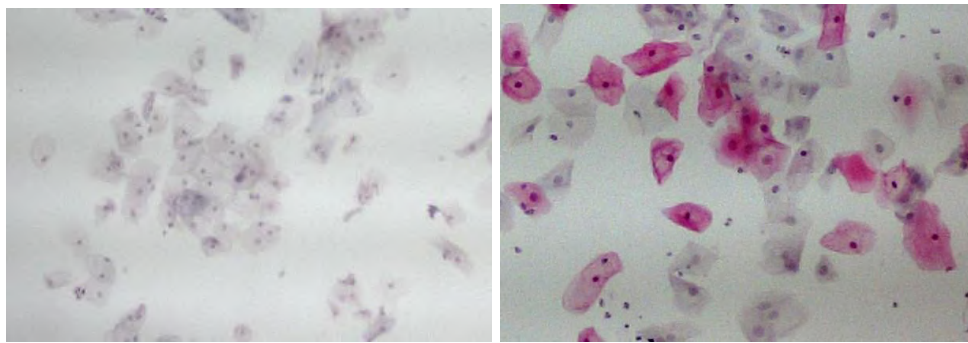
% abaixo da diagonal = 7,22%

Os resultados de comparação entre os métodos de preparação de lâminas automatizado e manual da mesma amostra preservada pelo meio CellPreserv estão descritos nas tabelas 9 e 10.

Na tabela 9 temos a leitura do primeiro observador comparando os resultados das amostras preparadas pelo método automatizado e posteriormente o manual da mesma paciente.

A porcentagem de concordância entre os dois métodos foi de 68,04% quando lidas pelo primeiro observador. Entre as duas amostras para o primeiro observador chegou a concordância de 7 (7,22%) das amostras Dentro dos limites de Normalidade, 57 (58,76%) como Alterações Benignas e inflamatório e 1 (1,03%) de Lesões Suspeitas/positivas.

Figura 12 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado e manual CP classificados como alterações benignas e posteriormente lesões suspeito/positivo pelo primeiro observador.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 276 automatizado (alterações benignas) e Lâmina 276 manual (LSIL). Aumento 400x .

Entre os resultados discordantes temos como um dado a ser observado a presença de 11 (11,34%) amostras classificadas como Alterações Benignas para o método automatizado e quando a amostra foi preparada pelo método manual foi classificada como Lesões Suspeitas/Positivas.

Tabela 9: Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo primeiro observador, segundo os achados morfológicos.

Automatizado	Insatisfatório	Dentro dos limites de normalidade	Alterações Benignas	Lesões Suspeito/positivas	Total
Manual					
Insatisfatório	1 1,03%	0	3 3,09%	0	4 4,12%
Dentro dos limites de normalidade	1 1,03%	7 7,22%	6 6,18%	0	14 14,43%
Alterações Benignas	3 3,09%	2 2,06%	57 58,76%	2 2,06%	64 65,98%
Lesões Suspeito/positivas	2 2,06%	1 1,03%	11 11,34%	1 1,03%	15 15,46%
TOTAL	7 7,22%	10 10,31%	77 79,38%	3 3,09%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,2432; z= 2,84 (p<0,0001)

% de concordância = 68,04%

% acima da diagonal = 11,34%

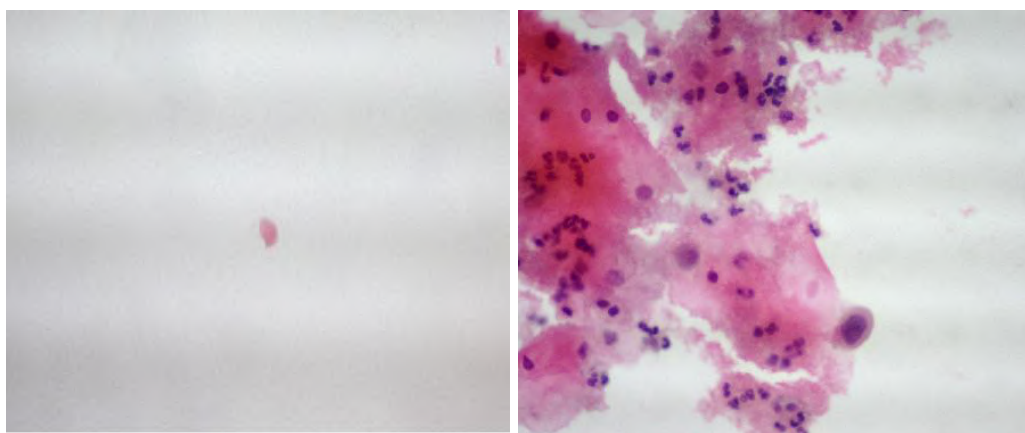
% abaixo da diagonal = 20,62%

A tabela 10 mostra os resultados do segundo observador na leitura de amostras preservadas em meio CellPreserv e preparadas pelos métodos automatizado e manual.

Com relação à leitura do segundo observador diante das amostras feitas pelos dois métodos temos uma porcentagem de concordância de 76,29%. Nessa concordância é apresentada 11 (11,34%) das amostras classificadas em ambos os métodos como Dentro dos limites de normalidade, 59 (60,82%) como Alterações Benignas e Inflamatórias e 2 (2,06%) como Lesões Suspeitas/Positivas. Ao total para o método automatizado foram 17 (17,52%) amostras classificadas como dentro dos limites de normalidade, 70 (72,16%) como Alterações Benignas e Inflamatória e 2 (2,06%) como Lesões suspeitas/positivas. Para o método manual com a mesma amostra foi classificada ao total

18 (18,55%) como dentro dos limites de normalidade, 70 (72,16%) como alterações Benignas e inflamatórias e 2 (2,06%) como lesões suspeitas/positivas.

Figura 13 – Esfregaço de lâminas preparadas pelo método automatizado e manual CP classificados como alterações benignas e posteriormente lesões suspeito/positivo pelo segundo observador.



Fonte: Acervo laminário URC. Lâmina 214 automatizado (insatisfatório) e Lâmina 214 manual (LSIL). Aumento 400x .

Para os dados de discordância temos 1 (1,03%) classificada como insatisfatória quando o método foi automatizado e para o método manual foi classificada como lesão suspeita/positiva e 4 (4,12%) amostras classificadas como alterações benignas quando o método foi automatizado e classificada como lesões suspeitas/positivas para o método manual.

Tabela 10: Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo segundo observador, segundo os achados morfológicos.

Automatizado	Insatisfatório	Dentro dos limites de normalidade	Alterações Benignas	Lesões Suspeito/positivas	Total
Manual					
Insatisfatório	2 2,06%	0	1 1,03%	0	3 3,09%
Dentro dos limites de normalidade	2 2,06%	11 11,34%	6 6,18%	0	19 19,59%
Alterações Benignas	3 3,09%	6 6,18%	59 60,82%	0	68 70,10%
Lesões Suspeita/s/positivas	1 1,03%	0	4 4,12%	2 2,06%	7 7,22%
Total	8 8,24%	17 17,52%	70 72,16%	2 2,06%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,4573; z= 4,84 (p=0,0001)

% de concordância = 76,29%

% acima da diagonal = 7,22%

% abaixo da diagonal = 12,37%

Na tabela 11 estão os resultados da mesma amostra feita pelos dois métodos para o primeiro observador, porém levando-se em conta os resultados liberados como Suspeito/positivo para essas técnicas. Nesse caso temos uma concordância entre as duas técnicas pelo mesmo observador de 84,53%. A concordância para as lâminas negativas é de 81 (83,50%) e 13 (13,40%) amostras foram classificadas como negativas no método automatizado e para o método manual foi classificada como suspeito/positivo.

Tabela 11: Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo primeiro observador, diante dos casos suspeito/positivos.

Manual			
Automatizado	Suspeito/positivo	Negativo	Total
Suspeito/positivo	1 1,03%	2 2,06%	3 3,09%
Negativo	13 13,40%	81 83,50%	94 96,91%
Total	14 14,43%	83 85,57%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,0703; z= 0,9463 (p=0,1720)

% concordância = 84,53%

Na tabela 12 estão os resultados de lesões suspeito/positivas com relação aos resultados considerados negativos, incluindo dentro dos limites de normalidade e alterações benignas, encontrados pelo segundo observador na análise das lâminas feitas pelo método automatizado e manual. Para o segundo observador temos uma porcentagem de concordância entre as metodologias automatizada e manual para as lesões suspeitas/positivas de 94,84%. Em ambos os métodos foram classificadas 2 (2,06%) amostras como suspeitas/positivas e 90 (92,78%) como negativas.

A discordância para o segundo observador em relação aos dois métodos de preparo de lâmina para a mesma amostra foi de 5 (5,15%) amostras classificadas como suspeito/positivos para o método manual enquanto para o método automatizado foi classificado como negativo.

Tabela 12: Esfregaço de mulheres preservados no meio CellPreserv, confeccionados pelo método manual e automatizado, analisado pelo segundo observador, diante dos casos suspeito/positivos.

Manual Automatizado	Suspeito/positivo	Negativo	Total
Suspeito/positivo	2 2,06%	0	2 2,06%
Negativo	5 5,15%	90 92,78%	95 97,94%
TOTAL	7 7,22%	90 92,78%	97 100%

Teste Kappa

Kw= 0,4835 z= 5,47 (p<0,0001)

% concordância = 94,84%

5. DISCUSSÃO

A citologia em meio líquido veio como uma grande inovação no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino. Essa técnica permite, por meio de uma única coleta, promover a análise citológica para identificação de lesões epiteliais escamosas ou glandulares e possibilitar a utilização do material residual para identificação molecular de agentes infecciosos e o principal agente envolvido na carcinogênese uterina, o Papilomavirus Humano de alto risco oncogênico.^{32,33}

Ao escolher um método de preparação de material celular para a análise deve-se levar em conta alguns parâmetros como número de casos realizados pelo laboratório, tempo consumido no preparo do material, necessidade de equipamentos e principalmente a preservação do material em meio líquido.³⁴

Com relação ao tempo de preparo de amostras, ambos os métodos estudados não apresentaram diferença significativa no tempo de preparo. Quando preparado da mesma quantidade de amostras no método manual e automatizado, o tempo foi de 4 horas aproximadamente para os dois métodos.

O mesmo pôde ser observado quanto à adequabilidade da amostra e o desempenho dos observadores.

Para o primeiro observador não houve alteração significativa na porcentagem de amostras satisfatórias e insatisfatórias principalmente da mesma paciente, preparadas por métodos diferentes, para o método automatizado foram 90 (92,78%) classificadas como satisfatório e o método manual 93 (95,88%). Isso sugere que as técnicas apresentam a mesma eficiência com relação à adequabilidade da amostra.

Na análise do segundo observador houve uma diferença numérica entre as amostras preparadas pelo método automatizado e manual, porém não significativa, 89 (91,75%) amostras foram classificadas como satisfatória no

método automatizado e 94 (96,61%) amostras satisfatórias para o método manual, já 8 (8,25%) das amostras foram classificadas como insatisfatória para o método automatizado e 3 (0,75%) para o método manual. Para o método manual houve mais amostras classificadas como satisfatórias.

Quando analisamos as amostras no quesito adequabilidade, observou-se uma concordância de 97,03% entre os observadores. Das 202 amostras preparadas pelo método manual, 184 amostras (91%) foram classificadas por ambos como satisfatória, indicando uma excelente qualidade entre os observadores. Ao analisar os dados obtidos no método automatizado foi encontrado 99,00% de concordância, o que também mostra uma excelente qualidade entre eles.

Das 97 amostras preparadas pelo método automatizado, 89 (91,75%) foram classificadas por ambos observadores como satisfatório, apresentando uma excelente concordância de 99,0% entre os observadores.

Um estudo realizado por Sharma J. *et al* com 140 pacientes, 130 (93%) das amostras foram classificadas como satisfatória.³⁵ As porcentagens de amostras satisfatórias para os métodos estudados e para os dois observadores nesse estudo está de acordo com estudos anteriores sobre amostras preservadas em meio líquido.

De acordo com alguns estudos, o método de transferência de células para a lâmina é o que pode resultar em uma melhor representação da amostra.⁵ Porém nesse estudo os métodos apresentaram uma proporção equivalente, para ambos os observadores, diante da adequabilidade da amostra preparada pelos métodos automatizado e manual.

Em ambos os métodos de preparação de lâminas, nas amostras classificadas como satisfatórias as células estavam bem distribuídas, ausência de sangue ou restos celulares, boa representatividade celular e fixação adequada.

Já se sabe que a citologia em meio líquido melhora a qualidade, aumentando a sensibilidade do método, permitindo que as lesões sejam identificadas com maior segurança, ajudando na diminuição do índice de câncer de colo uterino bem como os custos do tratamento dessa enfermidade. Um estudo realizado por Araque *et al* 2015 mostrou que a citologia em meio líquido permitiu diagnosticar 20 (12,74%) amostras com resultados suspeitos/positivos de um total de casos estudados de 157.⁹

Para o método manual, nesse estudo, de 202 amostras, o primeiro e o segundo observadores classificaram 14 (6,93%) amostras como lesões suspeitas/positivas. A concordância entre eles diante dos achados morfológicos foi de 83,66%. A porcentagem de discordâncias de 14,36% diante dessas amostras demonstra que o primeiro observador é mais criterioso do que o segundo observador.

Isso pode ser explicado devido ao tempo de experiência entre os dois observadores. O primeiro observador apresenta maior tempo de experiência profissional que o segundo observador. A experiência entre os observadores já é utilizada na revisão hierárquica das amostras em laboratório para controle de qualidade.³⁶

De acordo com Tavares *et al*, a revisão de lâminas por diferentes observadores permite avaliar o desempenho individual e possibilita a detecção de diferenças e dificuldades de cada profissional, bem como identificar o profissional da equipe com melhor perfil para escrutínio de rotina e para revisão do controle de qualidade.³⁶

Para análise do material celular por microscopia óptica faz-se necessário o alinhamento de informações e o treinamento dos profissionais, nivelando os critérios citomorfológicos para identificar as lesões e qualificar as amostras quanto à qualidade. Segundo Machado *et al*, parâmetros como celularidade,

distribuição do material na lâmina e observação da morfologia celular devem ser valorizados na qualificação das atipias.¹⁷

Em outro estudo realizado por Lee *et al* 2012, com 938 amostras coletadas, verificou-se a taxa de detecção de atipias celulares na citologia em meio líquido foi de 2,24%,³⁷ o que se aproxima desse estudo com relação ao método automatizado. Nesse estudo 2 (2,06%) amostras preparadas pelo método automatizado e preservadas em meio Cellpreserv em concordância entre os dois observadores foram classificadas como lesões suspeitas/positivas. Nas amostras preparadas pelo método manual e preservadas no meio Cellpreserv, em concordância entre os dois observadores esse estudo mostra 5 (5,15%) amostras suspeitas/positivas. E as amostras preparadas pelo método manual e preservadas em meio Clearprep foram 12 (5,94%).

Esse estudo diverge de outro realizado por Stabile *et al* 2012 com 97 mulheres das quais 9 casos foram classificados como suspeitos e 2 casos como lesões positivas totalizando assim 11 (11,34%) casos de lesões suspeitas/positivas.¹²

As amostras preparadas pelo método manual dependem muito de um profissional bem treinado e a quantidade da amostra.³⁴ Isso poderia explicar a diferença entre a quantidade, mesmo que pequena, das amostras suspeitas/positivas em concordância entre os dois métodos.

Ao comparar o método manual e automatizado utilizando a mesma amostra de acordo com o primeiro observador, temos uma concordância entre os métodos de 68,04%, e de acordo com o segundo 76,29%. Diante das discordâncias encontradas nesse estudo pelos dois observadores nos métodos automatizado e manual, os resultados mostram que o método manual pode ser mais eficiente do que o automatizado.

A concentração de células no método manual pode ser um dos fatores que interferiu nos resultados. Já que nesse estudo as amostras foram primeiro processadas pelo método automatizado e posteriormente o restante da amostra foi preparado pelo método manual.

Mesmo assim alguns resultados foram importantes, mesmo que não significantes. Para o primeiro observador, 13 (13,40%) amostras foram classificadas como negativas quando preparadas pelo método automatizado e quando preparadas pelo método manual foram classificadas como suspeito/positivas.

O mesmo não ocorreu para o segundo observador com tempo menor de experiência. O segundo observador classificou 5 (5,15%) das amostras como negativas quando preparadas pelo método automatizado e suspeitos/positivo para o método manual.

A precisão de diagnóstico principalmente das lesões suspeitas e positivas é de extrema importância para prevenir a progressão da doença invasiva bem como no tratamento do câncer de colo uterino.³³

A melhoria na qualidade da amostra trará maior segurança no processo de rastreamento do câncer de colo uterino, diminuindo assim a incidência de morte pela doença e uma melhoria nos programas de rastreamento da lesão.

6. CONCLUSÕES

Por meio deste estudo, podemos concluir que:

Ambos os métodos apresentaram índices equivalentes entre si e de acordo quanto à adequabilidade da amostra aumentando índice de concordância entre os observadores.

A distribuição celular e ausência de artefatos para ambos os métodos contribuiu para uma melhor qualidade da amostra.

Uma pequena diferença na identificação de alterações celulares aconteceu entre os observadores, o que nos leva a sugerir um treinamento constante e revisão hierárquica das amostras.

Diante dos achados morfológicos, ambos os observadores concordam que o método manual se mostrou tão eficiente quanto o automatizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- Silva, EPS; Vietta, GG; Golfetto, L; Zonta, MA; Gularte, ERG; Menezes, ME; Cobianchi, D. **Frequency and Genotyping of Human Papillomavirus in Women submitted to cytology.** J.Bras Doenças Sex Transm. 2015; 27 (1-2):22-28
- 2- Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Estimativa para 2018 do câncer do colo uterino no Brasil. Edição Coordenação de Ensino.** Rio de Janeiro. (Acessado em 2018, Dezembro; Disponível: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio)
- 3- Navarro, C; Fonseca, AJ; Sibajev, A; Souza, CIA, Araujo, DS; Teles, DAF; Carvalho, SGL; Cavalcante, KWM; Rabelo, WL. **Cobertura do rastreamento do câncer de colo uterino em região de alta incidência.** Rev Saúde Pública 2015;49:17.
- 4- Ayres, ARG; Silva, GA. **Prevalência de Infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática.** Rev Saúde Pública 2010;44(5):963-74
- 5- Barcelos, MRB; Lima, RCD; Tomasi, E; Nunes, BP; Duro, SMS; Facchini, LA. **Quality of cervical cancer screening in Brazil: external assessment of the PMAQ.** Rev Saúde Publica. 2017; 51-67
- 6- Rozemeijer, K; Penning C; Siebers, AG; Naber, SK; Matthijsse, SM; van Ballegooijen, M; van Kemenade, FJ; Kok, IMCM. **Comparing SurePath, ThinPrep, and conventional cytology as primary test method: SurePath is associated with increased CIN II+ detection rates.** Cancer Causes Control (2016) 27:15–25

- 7- Barrera-Herrera, LE; Abello, Y; Ruiz, N; Rodríguez-Urrego. **Comparacion entre lãs técnicas de citocentrifugado y base liquida SurePath™ para procesamiento de muestras no ginecológicas: Verificacion de La validacion.** Revista Colombiana de Cancerologia. 2016; 20 (1): 10-16.
- 8- Correa, FM; Russomano, FB. **Novas Tecnologias de Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Quem de Fato se Beneficia?** Revista Brasileira de Cancerologia 2012; 58(3): 525-527.
- 9- Araque, SEZ; Blanco, MG. **Citologia en base Liquida: parâmetros de eficácia.** Ver Obstet Ginecol Venez. 2015; 75 (3): 187-199.
- 10-Palhano, R.M.A.B. **POPs Segundo a Lista de Verificação da Sociedade de Citologia Clínica.** 2004. 19-20; 123-128.
- 11-Gibb, Randall K. **The Use of Liquid-Based Cytology in Cervical Cancer Screening.** Rev Obstet Gynecol. 2001. Volume 4. 51-55p.
- 12- Stabile, SAB; Evangelista, DHR; Talamonte, VH; Lippi, UG; Lopes, RGC. **Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido.** Einstein. 2012; 10 (4): 466-72.
- 13- Papanicolaou GN; Traut, HF. **Diagnosis of Uterine Cancer by the vaginal smear.** Yale Journal of Biology and Medicine. 1943. 46p.
- 14-Koss, LG; Gompel, C. **Introdução á Citopatologia Ginecológica, com correlações Histológicas e Clínicas.** Editora Roca. 2006. 91-92.

- 15-Costa, MOLP; Heráclio, SA; Coelho, AVC; Acioly, VL, Souza, PRE, Correia, MTS. **Comparison of conventional Papanicolaou cytology samples with liquid-based cervical cytology samples from women in Pernambuco, Brazil.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2015. 48(9): 831-838
- 16- Tambouret RH. **The evolution of the Papanicolaou smear.** Clinical Obstetrics and Gynecology. 2013; 56(1): 3-9.
- 17-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. Inst. Adolfo Lutz, 67(2):148-155, 2008.
- 18- Singh, VB; Gupta, N; Nijhawan, R; Srinivasan, R; Suri, V; Rajwanshi, A. **Liquid-based cytology versus conventional cytology for evolution of cervical Pap smears: Experience from the first 1000 split samples.** Indian J Pathol Microbiol. 2015 Jan-Mar; 58(1):17-21.
- 19-Takei, H; Ruiz, B; Hicks, J. **Comparison of conventional Pap Smears and a Liquid-based Thin-Layer Preparation.** Am J Clin Pathol 2006; 125: 855-859.
- 20-Girianelli, VR; Thuler, LCS. **Evaluation of Agreement between Conventional and Liquid-Based Cytology in Cervical Cancer Early Detection Based on Analysis of 2.091 smears: Experience at the Brazilian National Cancer Institute.** Diagnostic Cytopathology. 2007. 35 (9): 545-549.
- 21-Filho, AL; Namiyama, G; Filho, AC; Viann, MR; das Dores, GB; Taromaru, E. **Sistema DNA-Citoliq (DCS): Um Novo Sistema para Citologia em Base Líquida – Aspectos Técnicos.** DST – J bras Doenças Sex Transm. 2005. 17(1): 56-61, 2005.

- 22- Cuzick, J; Ahmad, AS; Austin, J; Cadman, L; Ho, L; Terry, G; Kleeman, M; Asdown-Barr, L; Lyons, D; Stoler, M; Szarewski, A. **A comparison of different human papillomavirus tests in PreservCyt versus SurePath in a referral population - PREDICTORS 4.** Journal of Clinical Virology. 2016 (82): 145–15.
- 23- Abulafia, O; Pezzullo, JC; Sherer, DM. **Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey.** Gynecologic Oncology. 2003. 90: 137–144
- 24- Site pesquisado: https://www.hologic.com/sites/default/files/2018-05/MAN-02203-602_003_02.pdf (acesso 27-10-2018, as 9:46).
- 25-Site pesquisado: <http://diagnocel.com.br/diagnostico-in-vitro/bd-surepath-prepmate/>(acesso 27-10-2018, as 9:50).
- 26-Guo, J; Cremer, M; Maza, M; Alfaro, K; Felix, JC. **Evaluation of a Low-Cost Liquid-Based Pap Test in Rural El Salvador: A Split-Sample Study.** J Low Genital Tract Dis. 2014. 18 (2):151-155.
- 27-Site pesquisado: <http://www.kolplast.com.br/portfolio/cellpreserv/> (acesso 16/12/2018 às 11:12h)
- 28-Solomon N, D; Nayar, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal. Definições, Critérios e Notas explicativas.** Editora: Revinter. 2º edição.
- 29-Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (INCa/MS). **Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde.** J Bras Patol Med Lab 2006. 42 (5): 351-373.
- 30-Site: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Nomenclatura_Internet.pdf (acesso 02/01/2019 às 13:16)
- 31- Siegel, S. e Castellan, NJ. **Estatística não Paramétrica para Ciência do Comportamento.** 2º edição. Editora Artmed. 2006. P: 448.

- 32-Alves, VAF; Filho, AC; Namiyama, G; Filho, AL; Vianna, MR; Taromau, E;Dôres, GB. **Citologia de Base-Líquida pelo Sistema DNA-Citoliq (DCS) – Eficácia na Identificação da Microbiota Vaginal.** DST – J Brás Doenças Sex Transm. 2004. 16 (4): 27 -31.
- 33- Ogilvie, GS; Krajden, M; van Niekerk, DJ; Martin, RE; Ehlen, TG; Ceballos, K; Smith, LW; Kan, L; Cook, DA; Peacock, S; Stuart, GCE; Franco, EL; Coldman, AJ. **Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomized - controlled trial – the HPV FOCAL Study.** British Journal of Cancer 2012. 107: 1917–1924
- 34- Alves, VAF; Bibbo, M; Schmitt, FCL; Milanezi, F; Filho, AL. **Comparison of Manual and Automated Methods of Liquid-Based Cytology. A morphologic Study.** Acta Cytologica. 2004. 48 (2): 187-193.
- 35- Sharma, J; Toi, PCH; Siddaraju, N; Sundareshan, M; Habeebullah, S. **Uma análise comparativa da citologia cervicovaginal convencional e SurePath à base de líquido: um estudo de 140 casos.** J Cytol . 2016. 33 (2): 80-84.
- 36-Tavares, SBN; Amaral, RG; Manrique, EJC; Sousa, NLA; Albuquerque ZBP; Zeferino, LC. **Controle de Qualidade em Citopatologia Cervical: Revisão de literatura.** Revista Brasileira de Cancerologia. 2007. 53(3): 355-364.
- 37- Lee, JD; Oh, YH; Lee, SO; Kim, JY. **Comparison of Diagnostic Cytomorphology of Atypical Squamous cells in liquid-based Preparations an conventional Smears.** The Korean Journal of Pathology. 2012; 46: 365-369.