

Preparaciones de base líquida vs. citología convencional: Adecuación de las muestras y coincidencia de diagnóstico en lesiones orales

Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions

Fábria H Hayama ⁽¹⁾, Ana CF Motta ⁽²⁾, Antonio de Padua G Silva ⁽³⁾, Dante A Migliari ⁽⁴⁾

- (1) Profesor Asistente, Departamento de Diagnóstico Oral, Escuela de Odontología, Universidad Federal de Paraná, Curitiba, PR, Brasil
 (2) Investigador Asociado, Departamento de Diagnóstico Oral, Escuela de Odontología, Universidad de São Paulo, SP, Brasil
 (3) Profesor y Presidente, Departamento de Patología Médica, Escuela de Medicina, Universidad Católica de Paraná, Curitiba, PR, Brasil
 (4) Profesor Agregado, Departamento de Diagnóstico Oral, Escuela de Odontología, Universidad de São Paulo, SP, Brasil

Correspondencia / Address:

Dante A. Migliari

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia,

Departamento de Estomatologia, Disc. de Semiologia

Av Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária

São Paulo, SP – Brasil 05508-900

Teléfono y Fax: + (55-11) 3864 1372

E-mail: damiglia@usp.br

Recibido / Received: 5-09-2003 Aceptado / Accepted: 22-02-2004

Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed
 -EMBASE, Excerpta Medica
 -Índice Médico Español
 -IBCS

Hayama FH, Motta ACF, Silva APG, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2005;10:115-22.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

RESUMEN

Objetivo: Comparar la efectividad de la muestra y la coincidencia de diagnóstico entre preparaciones de base líquida y frotis convencionales en lesiones orales, y probar la viabilidad de la prueba inmuno-citoquímica en preparaciones de base líquida de lesiones de carcinoma oral. **Material y Métodos:** Se obtuvieron muestras de 44 pacientes. Primeramente se prepararon frotis convencionales, usando un dispositivo cytobrush. A continuación se sumergió el cepillo que contenía el material residual en un líquido conservante. La muestra en el mismo fue procesada de acuerdo con las indicaciones del fabricante (AutoCyte, Inc. Elon College, North Carolina, USA). Se tiñeron preparaciones de ambas técnicas de acuerdo con el método de Papanicolaou. Para la prueba inmuno-citoquímica se usaron conjuntamente AE1/AE3 (Dako, CA, USA) para las lesiones de carcinoma oral, de acuerdo con el método de la Estreptovidina-biotina-peroxidasa. Se usó la prueba exacta de Fisher; fijándose la probabilidad significativa en $p \leq 0.05$. **Resultados:** Ambas técnicas coincidieron en el diagnóstico citológico en todos los casos donde se usó una muestra adecuada; en 3 casos el frotis convencional mostró hipocelularidad y, por lo tanto, resultó inadecuado para el análisis. En el análisis de muestras, la citología de base líquida mostró una mejora general estadísticamente significativa, de un 41% en espesura de frotis y de un 66% en la distribución de células ($p \leq 0.05$), además de una reducción en la superposición de células y la presencia de sangre ($p \leq 0.05$). La morfología celular se observó

ABSTRACT

Objective: To compare specimen adequacy and diagnostic agreement between liquid-based preparations and conventional smears in oral lesions, and to test the viability of immunocytochemical assay in liquid-based preparations from oral carcinoma lesions. **Material and Methods:** Samples were collected from 44 patients. Conventional smears were prepared first, using a cytobrush device. Then the brush, containing the residual material, was immersed in a preservative fluid. The sample in the preservative fluid was processed according to the manufacturer directions (AutoCyte, Inc. Elon College, North Carolina, USA). Slides of both techniques were stained by Papanicolaou method. For immunocytochemical assay, a cytokeratin pool AE1/AE3 (Dako, CA, USA) was applied in liquid-based preparations from oral carcinoma lesions following the Streptavidin-biotin-peroxidase method. Fisher's exact test was used; significance was set for $p \leq 0.05$.

Results: Both techniques agreed on cytologic diagnosis in every case they yielded an adequate specimen; in 3 cases conventional smear resulted in hypocellularity and therefore inadequate for analysis. On specimen analysis, the liquid-based cytology demonstrated a statistically significant, 41% overall improvement in smear thickness and 66% in cell distribution ($p \leq 0.05$), and a reduction in cell overlapping and presence of blood ($p \leq 0.05$). The cell morphology was better visualized in the liquid-based preparations. The immunocytochemical assay reactions were positive in all malignant cases, the visualization of the immu-

mejor en las preparaciones de base líquida. Las reacciones de la prueba inmuno-citoquímica fueron positivas en todos los casos de malignidad, siendo especialmente clara la observación de células inmuno-marcadas. *Conclusión:* Tanto las preparaciones de base líquida como los frotis convencionales son dignos de confianza desde el punto de vista del diagnóstico; el método de base líquida mostró una mejora general en la preservación de muestras, adecuación de ejemplares, observación de morfología celular y reproducibilidad.

Palabras clave: Lesiones orales, diagnóstico citológico, citología convencional, citología de base líquida.

INTRODUCCION

La citología exfoliativa es un proceso simple y no invasivo, que permite estudiar las células epiteliales de las superficies mucosas. Ese examen, conocido como frotis citológico convencional, fue originalmente ideado para la detección precoz de células cervicales cancerosas. Su aplicación en la práctica de la medicina oral ha sido restringida, ya que los cambios iniciales de la mucosa oral que indican malignidad se detectan preferentemente con la inspección oral y la biopsia. Además, la gran variación en la calidad técnica de los frotis citológicos aumenta la probabilidad de fallos de diagnóstico en el examen microscópico. No obstante, el frotis citológico se ha usado en el diagnóstico de ciertos tipos de lesiones orales, la mayor parte de ellas provenientes de enfermedades causadas por virus u hongos (1). Actualmente con el progreso de la técnica citológica, que se ha traducido en el desarrollo de preparaciones de base líquida, el uso de esta técnica como herramienta auxiliar en el diagnóstico de lesiones de la mucosa oral ha despertado un renovado interés (2-4).

En las preparaciones de base líquida, la muestra y el dispositivo de recolección se transportan en un recipiente que contiene un líquido conservador. Eso permite la inmediata fijación de las células, con lo cual todo el material removido puede usarse. Esa técnica permite obtener preparaciones con abundancia de células dispersas en una capa fina y homogénea. Sangre, inflamación y mucus quedan reducidos y distribuidos por toda la preparación. El fondo claro que así se obtiene aumenta la sensibilidad y la calidad (5-7). Comparado con los frotis convencionales, el uso de preparaciones de base líquida ha permitido reducir considerablemente el número de preparaciones insatisfactorias o satisfactorias pero limitadas, debido a las características del ejemplar, lo que disminuye el número de resultados falsos negativos (8-10).

El propósito de este estudio es comparar el empleo de las preparaciones de base líquida con el de los frotis convencionales en el diagnóstico oral de rutina. Por otra parte, también se estudió la viabilidad de la prueba inmuno-citoquímica usando preparaciones de base líquida para lesiones cancerosas de células escamosas.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

El grupo de estudio estaba constituido por 44 pacientes

nostained cells being especially clear.

Conclusion: Both, the liquid-based preparation and conventional smear, are diagnostically reliable; the liquid-based method showed an overall improvement on sample preservation, specimen adequacy, visualization of cell morphology and reproducibility.

Key words: Oral lesions, cytologic diagnosis, conventional cytology, liquid-based cytology

INTRODUCTION

Exfoliative cytology is a simple, noninvasive procedure for studying epithelial cells of mucosal surfaces. This exam, known as conventional cytologic smear, was first designed for early detection of cervical cancer cells. Its application in the practice of oral medicine has been restricted, since early changes in oral mucosa related to malignancy are preferably handled with oral inspection and biopsy. Also, the great variation in technical quality of cytological smears increases the chance for a diagnostic failure on microscopic examination. Nevertheless, the use of cytologic smear has been used in the diagnosis of certain types of oral lesions, most of them related to viral and fungal diseases (1). Moreover, with improvements in cytologic techniques that have resulted in the development of liquid-based preparations, the use of this approach as an auxiliary tool in the diagnosis of oral mucosal lesions has gained a renewed interest (2-4).

In the liquid-based preparations, the sample and the collecting device are transported in a vial with preservative fluid, allowing an immediate fixation of cells, and all the scraped material can be used. This technique results in slides with a high cellularity dispersed in a homogeneous thin layer. Blood, inflammation and mucus are reduced and distributed randomly throughout the slide. The clear background thus obtained enhances sensitivity and quality (5-7). As compared to conventional smears, the use of liquid-based preparations has shown to greatly reduce the number of slides that are unsatisfactory or satisfactory but limited by specimen artifacts, diminishing the false negative results (8-10).

The aim of the present study was to compare the performance of liquid-based preparations with that of conventional smears in routine oral diagnosis. Additionally, we also tested the viability of immunocytochemical assay using liquid-based preparations from oral squamous cell carcinoma lesions.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study group consisted of 44 patients seen at the Clinic of Oral Diagnosis, University of São Paulo School of Dentistry (Table 1 summarizes the characteristics of these patients). The study protocol was approved by the Committee on Ethics of the University of São Paulo. Patients were informed with regard to the research objectives, methods, possible benefits and potential risks, and a written consent was obtained from all participants. Patients were enrolled consecutively; the only criterion applied for exclusion was for patients under regular use of topical oral medication.

examinados en la Clínica de Diagnóstico Oral de la Escuela de Odontología de la Universidad de São Paulo (La Tabla 1 resume las características de esos pacientes). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de São Paulo. Se informó a los pacientes sobre los objetivos de la investigación, métodos, posibles beneficios y riesgos, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Fue criterio de exclusión que los pacientes usaran regularmente medicación tópica.

Inmediatamente después de la recolección de material para análisis citológico, se hizo una biopsia de todas las lesiones, excepto de las que eran clínicamente sugestivas de infección por el virus de herpes simplex recurrente VHS, (con presencia de lesiones ulceradas recurrentes en mucosa queratinizada) o infección por *Cándida* (lesión eritematosa del paladar duro asociada a estomatitis por dentadura o sobreinfección de lesiones preexistentes, tales como liquen plano oral y leucoplasia). Las biopsias fueron sometidas a un examen histológico de rutina y, en casos con sospecha de enfermedades autoinmunes, también analizadas por inmunofluorescencia directa.

Preparación de muestras

Las muestras recogidas provenían de lesiones de: candidiasis (8 casos), liquen plano oral (8 casos), pénfigo vulgar (2 casos), penfigoide membrana mucosa (6 casos), carcinoma de células escamosas (11 casos), nevus esponjoso blanco (3 casos), leucoplasia (2 casos), lesiones de VHS recurrente (3 casos) y paracoccidiodomicosis (1 caso).

Las muestras fueron obtenidas mediante el uso de un dispositivo cytobrush (Adlin, Jaraguá do Sul, Brasil). Primeramente se preparó un frotis convencional pasando el cepillo a lo largo del portaobjetos de vidrio, que fue posteriormente fijado en etanol de 95%. Entonces el cepillo, conteniendo el resto de la muestra, fue sumergido en el medio de transporte, consistente en un conservante de base alcohólica (AutoCyte Inc., Elon College, North Carolina, USA) Tanto el frotis convencional como el frasco con células en suspensión fueron enviados al laboratorio Citopar (Curitiba, Brasil).

En el laboratorio, el frotis convencional fue procesado de acuerdo con la técnica de Papanicolaou. El material celular de base líquida contenido en el frasco fue procesado de acuerdo con las indicaciones del fabricante (AutoCyte, Inc.) El proceso incluía vórtex, centrifugación con reactivo de densidad, decantación y resuspensión de los gránulos de células seguida de sedimentación por gravedad sobre láminas revestidas de poli-l-lisina, y seguidamente por tinción con el colorante de Papanicolaou (8-11). En el caso de lesiones sugestivas de candidiasis, las preparaciones de base líquida fueron hechas por duplicado y una de ellas teñida con PAS (ácido periódico-Schiff). Los frotis convencionales fueron también teñidos con PAS después de ser decolorados con xileno.

Evaluación

Todas las preparaciones fueron examinadas por un citopatólogo que ignoraba el tipo de lesión de donde ellas habían sido extraídas. Para el análisis comparativo de ambas técnicas se usaron cinco parámetros: a) espesura b) distribución celular c) microbiota d) inflamación/leucocitos e) características. Cada uno de ellos fue clasificado en las categorías de satisfactorio,

Just after the collection of material for cytologic analysis, all lesions were biopsied except those clinically suggestive of recurrent herpes simplex virus (HSV) infection (presence of recurrent ulcerated lesions on keratinized mucosa) or *Candida* infection (erythematous lesion on the hard palate associated with denture stomatitis or as a superimposed infection in pre-existing lesions such as oral lichen planus and leukoplakia). The biopsies were submitted to routine histological examination, and, for those cases suspected of being autoimmune, also analyzed by direct immunofluorescence.

Specimen preparations

The collected specimens came from lesions of: candidiasis (8 cases), oral lichen planus (8 cases), pemphigus vulgaris (2 cases), mucous membrane pemphigoid (6 cases), squamous cell carcinoma (11 cases), white sponge nevus (3 cases), leukoplakia (2 cases), recurrent HSV lesions (3 cases) and paracoccidiodomycosis (1 case).

Specimens were collected using a cytobrush device (Adlin, Jaraguá do Sul, Brazil). A conventional smear was first prepared by stroking the brush along the glass slide which was later fixed in 95% ethanol. Then the brush, containing the remaining sample, was immersed into the transport medium, an alcohol-based preservative (AutoCyte, Inc., Elon College, North Carolina, USA). Both the conventional smear and the vial with cells in suspension were sent to Citopar laboratory (Curitiba, Brazil).

At the laboratory, the conventional smear was processed by Papanicolaou technique. The liquid-based cellular material in the vial was processed as directed by the manufacturer (AutoCyte, Inc.). The processing steps included: vortexing, density reagent centrifugation, decanting and resuspension of cell pellets followed by gravity sedimentation on poly-l-lysine coated slides, and subsequent staining with Papanicolaou stain (8-11). For lesions suggestive of candidiasis, the liquid-based preparations were made in double, one of the slides being stained by PAS (periodic acid-Schiff). For the some cases, the conventional smears were also stained by PAS after being destained with xylene.

Assessment

All slides were examined by the same cytopathologist, who was not aware of the type of the lesion from which the material was collected. For comparative analysis of both techniques five parameters were used: a) thickness b) cellular distribution c) microbiota d) leucocytes/inflammation e) artifacts. Each of the items was classified into the categories of satisfactory, satisfactory but limited, and unsatisfactory. For statistical analysis, Fisher's exact test was used. Significance was set at $p \leq 0.05$.

Immunocytochemical

Part of the liquid-based material from oral squamous cell carcinoma was also tested for its usefulness in immunocytochemical assays. Following a standard technique for a liquid-based preparation, the thin-layer specimens thus obtained were left unstained, and subsequently processed by the Streptavidin-biotin-peroxidase complex method without epitope retrieval, using primary antibodies against human cytokeratins (AE1/AE3 pool of cytokeratins) (12-14). The working dilution was 1/200 (M3515, Dako, CA, USA). The specimens were first fixed in 95% alcohol followed by incubation with 0.3% hydrogen peroxide, with blocking of endogenous biotin.

satisfactorio pero limitado e insatisfactorio. Para el análisis estadístico se usó la prueba exacta de Fisher. La significancia fue fijada en $p \leq 0.05$.

Inmuno-citoquímica

Parte del material de base líquida proveniente de carcinoma de células escamosas también fue probado con respecto a su utilidad en pruebas inmuno-citoquímicas. Siguiendo una técnica estandarizada para preparaciones de base líquida, las muestras de lámina fina así obtenidas fueron dejadas sin teñir y después procesadas por el método del complejo Estreptovidina-biotina-peroxidasa, sin recuperación del epítipo, usando anticuerpos primarios contra citoqueratinas humanas (conjunto de citoqueratinas AE1 / AE3) (12-14). La dilución fue de 1/200 (M3515, Dako, CA, USA). Las muestras fueron primeramente fijadas en alcohol de 95%, y después incubadas con peróxido de hidrógeno 0,3%, con bloqueo de biotina endógena. Los anticuerpos primarios fueron incubados durante 30 minutos, seguidos de Link de 20 minutos (Dako, CA, USA). Las muestras fueron inmuno-marcadas con el reactivo de Estreptovidina-Biotina durante 20 minutos, y el producto de la reacción revelado con diaminobencidina 0,5% (DAB, Dako, CA, USA). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina, deshidratadas con alcoholes, lavadas y montadas para evaluación. Los controles negativos se hicieron usando solución salina con fosfato tamponado (PBS), en lugar de anticuerpos primarios. Se definió como reacción positiva la presencia de gránulos rojo-pardos por todo el citoplasma de células epiteliales malignas (2,15-17).

RESULTADOS

En la tabla 2 aparecen los resultados del diagnóstico obtenidos por ambas técnicas. Una y otra llevaron al mismo diagnóstico y a la misma catalogación de clase de Papanicolaou, en todos los casos donde las muestras eran aptas para análisis. En 3 casos (1 de leucoplasia y 2 de nevus esponjoso blanco), el frotis convencional presentó hipocelularidad, lo que hizo imposible el diagnóstico citológico.

En la tabla 3 aparecen los datos de adecuación de las muestras. Entre los resultados satisfactorios, las preparaciones de base líquida mostraron estadísticamente una mejora en cuanto a delgadez (41%) y distribución de células (66%), al compararlas con las provenientes de la citología convencional ($p \leq 0.05$). En el caso de las muestras "satisfactorias pero limitadas", las preparaciones de base líquida mostraron reducción en la cantidad de células superpuestas (frotis grueso), distribución irregular de células, y en la presencia de sangre ($p > 0.05$). No se halló diferencia estadística en lo referente a inflamación por leucocitos, microbiota, artefactos y en los resultados insatisfactorios ($p > 0.05$).

En el análisis microscópico las preparaciones de base líquida mostraron mayor resolución de las muestras. En pénfigo vulgar, carcinomas de células escamosas, lesiones VHS e infecciones fúngicas, las preparaciones de base líquida presentaron una mejor morfología citológica (Figs. 1 y 2). En el caso de las lesiones por VHS, en particular, la observación de características histopatológicas indicadoras de infecciones por virus (binucleación, células polinucleadas) mejoró mucho con el uso de la técnica

Primary antibodies were incubated for 30 minutes, followed by Link for 20 minutes (Dako, CA, USA). The specimens were immunostained with the Streptavidin-Biotin reagent for 20 minutes, and the reaction product was developed with 0.5% diaminobenzidine (DAB, Dako, CA, USA). The specimens were then counterstained with hematoxylin, dehydrated by alcohols, cleared and mounted for assessment. The negative controls were made using phosphate-buffered saline (PBS) instead of the primary antibodies. A positive staining reaction was defined as the presence of red-brown granules throughout the cytoplasm of malignant epithelial cells (2,15-17).

RESULTS

The results of the diagnosis obtained by both techniques are shown in Table 2. The two techniques led to the same diagnosis and the same Papanicolaou-class assignment in all cases whenever the specimens were adequate for analysis. In 3 cases (1 of leukoplakia and 2 of white sponge nevus) the conventional smear was hypocellular, making the cytologic diagnosis impossible. Data of specimen adequacy are shown in Table 3. Among the satisfactory results, the liquid-based preparations showed a statistically higher improvement in thinness (41%) and cell distribution (66%) as compared with those of conventional cytology ($p \leq 0.05$). For the "satisfactory but limited" specimens, the liquid-based preparations showed a reduction in the number of cell overlappings (thick smear), uneven cell distribution, and presence of blood ($p \leq 0.05$). No statistical difference was found in regard to leucocytes/inflammation, microbiota, artifacts, or unsatisfactory results ($p > 0.05$).

On microscopy analysis, the liquid-based preparations resulted in higher specimen resolution. In pemphigus vulgaris, squamous cell carcinomas, HSV lesions and fungus infections the liquid-based preparations presented a better cytological morphology (Figs. 1 and 2). For HSV lesions, in particular, the observation of the cytopathologic features indicative of viral infections (binucleation, multinucleated cells) was greatly improved with the liquid-based technique (Fig. 3).

The immunocytochemical assay for malignant cells using liquid-based preparation showed a positive reaction with AE1/AE3 cytokeratin in all 11 cases tested, with cells staining in red-brown pattern (Fig. 4).

DISCUSSION

Since liquid-based cytology was developed in the 1990s various comparative studies have shown that it can offer significant advantages over the conventional exfoliative cytology. Results obtained from uterine cervix exams, for example, have shown that the liquid-based preparations reduce the problems related to sampling error, poor transfer and fixation of the cellular sample (8-11,18). In cervical uterine cancer screening, the liquid-based preparations have also demonstrated a significant reduction in false-negative rates as compared with those of conventional smears (7-10). Probably owing to the paucity of studies on liquid-based cytology for examination of the oral mucosa, the conventional method is still the most often used. The aim of the present study was to compare both techniques in terms

de base líquida (Fig. 3).

La prueba inmuno-citoquímica para células malignas, usando una preparación de base líquida, mostró una reacción positiva con citoqueratina AE1/AE3 en los 11 casos experimentados, tiñéndose las células con un patrón rojo pardo (Fig. 4).

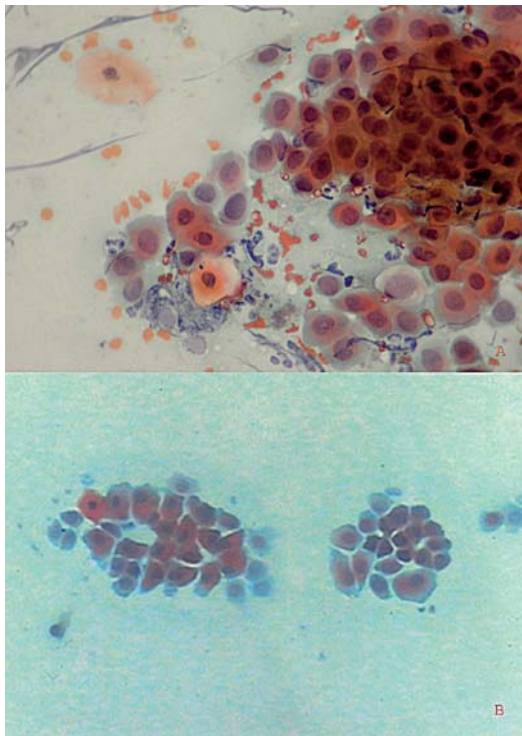


Fig. 1. Pénfigo vulgar. a) Citología convencional. Frotis con sangre y leucocitos, agrupamientos de células escamosas intermedias y parabasales. b) Citología de base líquida. Agrupamientos de células escamosas intermedias y parabasales (Papanicolaou 400X).

Pemphigus vulgaris. A) Conventional cytology. Smear with red blood cells and leukocytes, groups of intermediate and parabasal squamous cells. B) Liquid-based cytology. Loose flat groups of squamous intermediate and parabasal

DISCUSION

Desde que la citología en base líquida fue introducida, en la década de 1990, diversos estudios comparativos mostraron que ella puede ofrecer ventajas significativas sobre la citología exfoliativa convencional. Los resultados obtenidos en exámenes de cuello uterino, por ejemplo, han mostrado que las preparaciones de base líquida reducen los problemas de errores de muestreo, transferencia y fijación deficientes de la muestra de células (8-11,18). En la investigación de cáncer uterino, las preparaciones con base líquida han mostrado también una reducción significativa en la proporción de resultados falsos-negativos, al compararlos con los frotis originales (7-10). Debido probablemente a la escasez de estudios sobre citología de base líquida para el examen de la mucosa oral, el método convencional es todavía el más usado. El propósito de este estudio fue comparar ambas técnicas en términos de adecuación de la muestra y coincidencia de diagnósticos en el caso de diversos tipos de lesiones orales. La coincidencia de diagnóstico entre ambas técnicas, en el

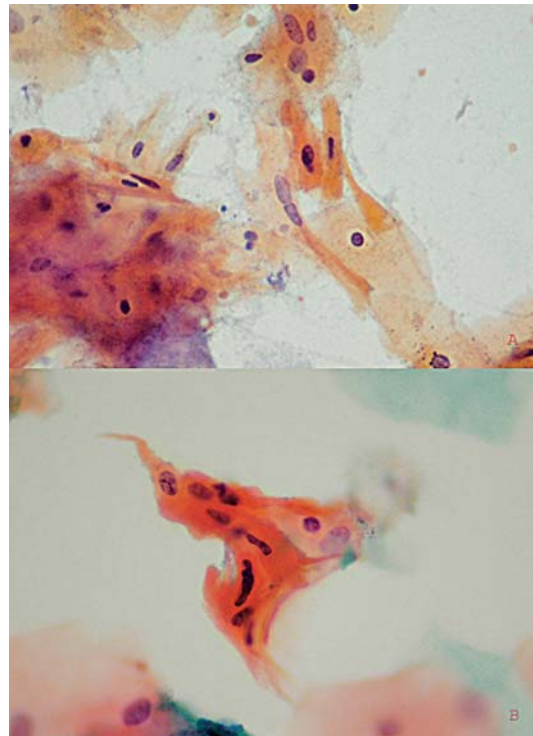


Fig. 2. Carcinoma de células escamosas. a) Citología convencional. Frontis con fondo sucio, bacterias y células escamosas atípicas elongadas. b) Citología de base líquida. células escamosas atípicas con polimorfismo celular e hiperchromatismo nuclear (Papanicolaou 400X).

Squamous cell carcinoma. A) Conventional cytology. Smear background with bacteria, elongated atypical squamous cells. B) Liquid-based cytology. Atypical squamous cell with cellular pleomorphism and nuclear hyperchromasia (Papanicolaou 400X).

Tabla 1. Características de los pacientes / **Table 1.** Characteristics of patients

Características/ Characteristics	Hombres/ Men N = 15 (Edad media/ Mean age) = 50.7)	Mujeres/ Women N = 29 (Edad media/ Mean age) = 49.3)	TOTAL N = 44
Caucásico/Caucasian	8	14	22
Noncaucásico/ Noncaucasian	7	15	22
Tabaco y alcohol/ Tobacco and alcohol	8	3	11
Tabaco/Tobacco	1	5	6
Alcohol	1	0	1
Enfermedad/Systemic diseases			
Hipertension y diabetes/ Hypertension and diabetes	0	2	2
Hipertensión/ Hypertension	2	5	7
Diabetes	0	1	1
Tiroiditis autoinmune/ Autoimmune thyroiditis	0	2	2
Artritis reumatoide/ Rheumatoid arthritis	1	3	4

Tabla 2. Resultados del diagnóstico obtenidos

Lesiones	Diagnósticos citológicos (no falsos positivos)	
	Citología de base líquida	Citología convencional
Carcinoma de células escamosas (11)	11	11
Pénfigo vulgar (2)	2	2
Paracoccidioidomicosis (1)	1	1
Candidiasis (8)	8	8
Lesiones de HSV (3)	3	3
	Clase II Papanicolaou * (no falsos positivos)	
	Citología de base líquida	Citología convencional
Liquen plano oral (8)	8	8
Leucoplasia (2)	2	1**
Penfigoide (6)	6	6
Nevus esponjoso blanco (3)	3	1**
Total (44 casos)	44	41

*Clase II Papanicolaou (alteraciones celulares benignas)

**imposible el diagnóstico citológico por hipocelularidad en 1 caso de leucoplasia y 2 casos de nevus esponjoso blanco

Tabla 3. Datos de adecuación de las muestras (n = 44 pacientes)/

Table 3. Comparison of specimen adequacy (n = 44 patients)

Categorías/ Description	Citología de base líquida/ Liquid-based cytology	Citología convencional/ Conventional cytology	P
Satisfactorios/Satisfactory			
Delgadez/Regular smear thickness	44 (100%)	26 (59%)	0,01*
Distribución de células/Regular cell distribution	30 (68%)	1 (2%)	0,01*
Satisfactorias pero limitadas/Satisfactory but limited by			
Frotis grueso/Thick smear	0 (0%)	15 (34%)	0,01*
Distribución irregular de células/Uneven cell distribution	13 (30%)	40 (91%)	0,01*
Inflamación/leucocitos/Leucocyte/inflammation	7 (16%)	14 (32%)	0,41 ^{ns}
Microbiota	12 (27%)	19 (43%)	0,06 ^{ns}
Sangre/Obscuring blood	0 (0%)	5 (11%)	0,05*
Artefatos/Artifacts	7 (16%)	14 (32%)	0,41 ^{ns}
Insatisfactorios/Unsatisfactory	0 (0%)	3 (7%)	0,12 ^{ns}

n = número de pacientes. Algunos pacientes fueron clasificados en mas de una subcategoría *Significativa, $p \leq 0.05$ ^{ns}No diferencia estadística, $p > 0.05$

n = number of specimens. Some patients had more than one subcategory.

*Significant, $p \leq 0.05$ ^{ns} Nonsignificant, $p > 0.05$

Table 2. Comparison of diagnostic agreement

Diseases	Cytologic diagnosis (no false positives)	
	Liquid-based cytology	Conventional cytology
Squamous cell carcinoma (11)	11	11
Pemphigus vulgaris (2)	2	2
Paracoccidioidomycosis (1)	1	1
Candidiasis (8)	8	8
Herpes simplex infection (3)	3	3
	Papanicolaou Class II* (no false positives)	
	Liquid-based cytology	Conventional cytology
Oral lichen planus (8)	8	8
Leukoplakia (2)	2	1**
Mucous membrane pemphigoid (6)	6	6
White sponge nevus (3)	3	1**
Total (44 cases)	44	41

*Papanicolaou Class II (benign cellular changes)

**No diagnosis due to hypocellular specimen in 1 case of leukoplakia and 2 cases of white sponge nevus

of specimen adequacy and diagnostic agreement from various types of oral lesions.

Diagnostic agreement was very high between both techniques in the examination of 44 lesions, since they matched in all instances in which both techniques yielded an adequate specimen; in 3 cases the conventional smear was hypocellular and therefore inadequate for analysis. In regard to specimen adequacy, the slides processed by liquid-based preparations were advantageous for presenting a thin and uniform distribution of cellular material, in addition to a clear background due to reductions in both cell overlapping and the presence of blood.

Owing to these improvements, the liquid-based preparation yielded specimens wherein the cellular morphology was more clearly seen. For example, details of the cytopathic effects produced by HSV infection (nuclear hyperchromatism, binucleation, multinucleated cells) were enhanced in the liquid-based preparations (19). In autoimmune diseases, like pemphigus vulgaris, although both techniques were effective in making the diagnosis, the detection of cellular sheets showing loss of the intercellular cement (acantolysis) was better characterized in the liquid-based preparations. In the examination of the oral carcinoma lesions the liquid-based preparations also presented advantages over the conventional smears as they allowed for a better observation of cytological abnormalities and changes in the nuclear-cytoplasm ratio.

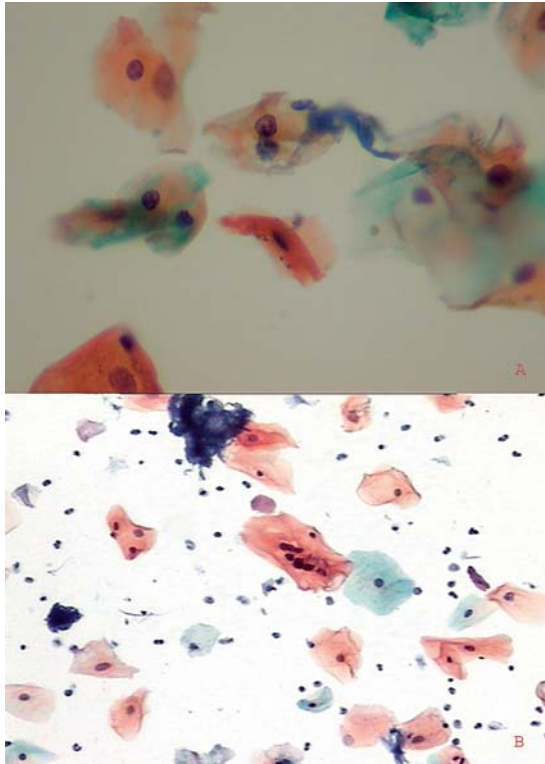


Fig. 3. Infección viral. Citología de base líquida. a) Binucleación (Papanicolaou 400X). b) Células polinucleadas (Papanicolaou 400X).
Viral infection (liquid-based cytology). A) Binucleation (Papanicolaou 400X). B) Multinucleated cell (Papanicolaou 400X).

en el examen de 44 lesiones, fue muy elevada porque ellas coincidieron en todos los casos donde ambas permitieron obtener un preparado adecuado; en 3 casos el frotis convencional acusó hipocelularidad y, por lo tanto, inadecuación para análisis. Con respecto a la adecuación de la muestra, las láminas procesadas por preparaciones de base líquida presentaron ventajas, tales como una distribución delgada y uniforme del material celular, aparte de un fondo claro, debido tanto a la reducción de la superposición de células como a la de la presencia de sangre. Debido a esos perfeccionamientos, las preparaciones de base líquida proporcionaron ejemplares donde se veía mejor la morfología celular. Por ejemplo, detalles de los efectos citopáticos provenientes de infección por (HSV) VHS (hipercromatismo nuclear, binucleación, células polinucleadas) mejoraron en las preparaciones de base líquida (19). En el caso de enfermedades autoinmunes, tales como pénfigo vulgar, aunque ambas técnicas fueron eficientes para hacer el diagnóstico, la percepción de láminas de células mostrando pérdida del cemento intercelular (acantólisis) fue mejor caracterizada en las preparaciones de base líquida. En el examen de lesiones producidas por carcinoma oral, ellas también presentaron ventajas sobre los frotis convencionales porque permitieron una mejor observación de las anomalías citológicas y de los cambios en la relación nuclear-citoplasmática.

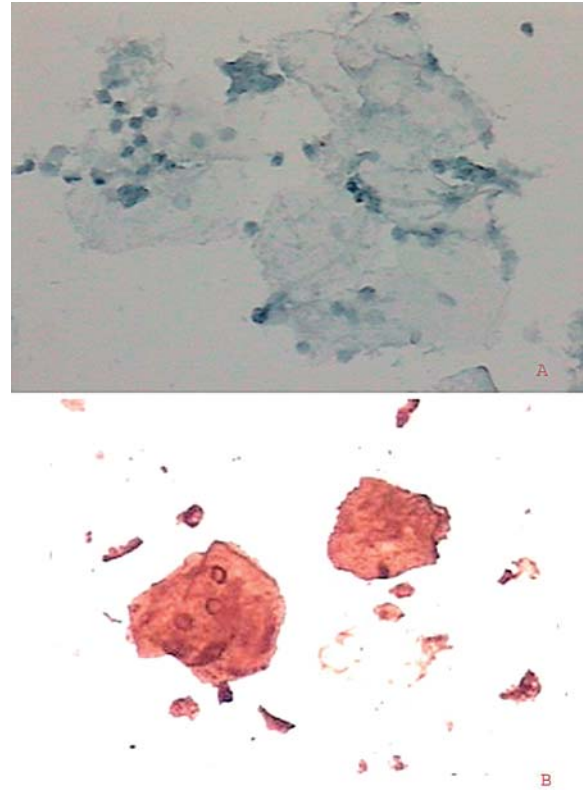


Fig. 4. Inmuno-citoquímica. Citología de base líquida. a) Controle negativo. b) Preparación con inmuno-expresión positiva AE1/AE3 (200X).
Immunocytochemical (liquid-based cytology). A) Slide showing negative control. B) Slide showing positive AE1/AE3 immunoexpression (200X).

An additional purpose of this study was to test immunocytochemical assay on smears processed by liquid-based preparations from oral squamous cell carcinoma. Antibody reaction against a pool of human cytokeratin (AE1/AE3) was positive in all cases of malignancy; the visualization of the immunostained cells was easily made due to the clear background of the slides. The immunocytochemical assay also showed some important advantages such as the relatively small amount of antibodies required and its reduced cost. Moreover, the immunocytochemical assay may be useful in resolving cases of problematic diagnosis by showing peculiar phenotypic expressions in epithelial cells. It is clear that although the conventional cytology is still the main technique used in routine smear examinations, this study showed that the liquid-based cytology showed an improved quality in cell morphology resolution among other advantages. The drawback of liquid-based cytology, however, is that it requires more sophisticated laboratory equipment as well as a better-trained staff to properly handle, process and analyze the samples. As liquid-based cytology method allows for the preparations of more than one slide per sample collected, there always will be enough material for other techniques besides Papanicolaou stain, such as PAS and Methamine Silver. Finally, the material preserved in the liquid-fixative solution has a long storage life, therefore remaining available for additional analyses as needed.

Otro propósito de este estudio fue experimentar la prueba inmuno-citoquímica en frotis de células escamosas de carcinoma oral procesados como preparaciones de base líquida. La reacción de los anticuerpos frente a un conjunto de citoqueratina humana (AE1/AE3) fue positiva en todos los casos de malignidad, y la visualización de las células inmuno-marcadas fue fácilmente realizada debido al fondo claro de las láminas. La prueba inmuno-citoquímica mostró también importantes ventajas, tales como la cantidad relativamente pequeña de anticuerpos requerida y su costo reducido. Además, la prueba inmuno-citoquímica puede ser útil para resolver casos de diagnóstico problemático, al mostrar expresiones fenotípicas peculiares en células epiteliales. Resulta claro que, aunque la citología convencional es todavía el principal método usado para los exámenes rutinarios de frotis, este estudio demostró que, entre otras ventajas, la citología de base líquida logra una mejor calidad en la resolución de la morfología celular. Su desventaja reside en que exige tanto un laboratorio con equipo más sofisticado como personal mejor entrenado para manejar debidamente el proceso y analizar las muestras.

Como todos los métodos de citología de base líquida permiten la obtención de más de una preparación por cada muestra recogida, siempre habrá material suficiente para aplicar otras técnicas, tales como PAS y Plata Metamina, además de la tinción de Papanicolaou. Finalmente, el material preservado en la solución de fijación líquida es de larga vida útil y, por lo tanto, está disponible para los exámenes adicionales que sean necesarios.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Sugerman PB, Savage NW. Exfoliative cytology in clinical oral pathology. *Aust Dent Journal* 1996;41:71-4.
2. Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T, Terasaki S, Kameyama T. Brush cytology of herpes simplex virus infection in oral mucosa: use of the thinprep processor. *Diagn Cytopathol* 1998;18:71-5.
3. Maksem JA, Weldmann J. Specialized Preparative devices are not needed for liquid-based thin-layer cytology: an alternate manual method using a metastable alcoholic gel. *Diagn Cytopathol* 2001;25:262-4.
4. Mallaoglu N, Wilson MJ, Cowpe JG. Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. *Diagn Cytopathol* 2001;25:83-5.
5. Linder J, Zahniser D. The ThinPrep Pap test - a review of clinical studies. *Acta Cytol* 1997;41:30-8.
6. Nasuti JF, Tam D, Gupta PK. Diagnostic value of liquid-based (ThinPrep) preparations in nongynecologic cases. *Digan Cytopathol* 2001;24:137-41.
7. Sprenger E, Schwarmann P, Kirkpatrick M, Fox W, Heinzerling RH, Geyer JW, et al. The false negative rate in cervical cytology. *Acta Cytol* 1996; 40:81-9.
8. Bishop JW, Bigner SH, Colgan TH, Husain M, Howell LP, McIntosh K, et al. Multicenter masked evaluation of AutoCyte Prep thin layers with matched conventional smears - including initial biopsy results. *Acta Cytol* 1998;42: 189-97.
9. McGoogan E, Reith A. Would monolayers provide more representative samples and improved preparations for cervical screening? - overview and evaluation of systems available. *Acta Cytol* 1996;40:107-19.
10. Vassilakos P, Cossali D, Albe X, Alonso L, Hohener R, Puget E. Efficacy of monolayer preparations for cervical cytology - emphasis on suboptimal specimens. *Acta Cytol* 1996;40:496-500.
11. Howell LP, Davis RL, Belk TI, Agdigos R, Lowe J. The AutoCyte preparation system for gynecologic cytology. *Acta Cytol* 1998;42:171-7.
12. Dabbs DJ, Abendroth CS, Grenko RT, Wang X, Radcliffe GE. Immunocytochemistry on the thinprep processor. *Diagn Cytopathol* 1997;17:388-92.
13. Ogden GR, Chisholm DM, Lane, EB. The utility of cytokeratin profiles for detecting oral cancer using exfoliative cytology. *Br J Oral Maxillof Surg* 1996;34:461-6.
14. Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, Leigh IM, Lane EB. Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol* 1987; 16:212-22.
15. Gherardi G, Marveggio C. Immunocytochemistry in head and neck aspirates. Diagnostic application on direct smears in 16 problematic cases. *Acta Cytol* 1992;36:687-96.
16. Suthipintawong C, Leong AS, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol* 1996;15:167-74.
17. Bongers V, Gordon BS, Vries N, Braakhuis BJM. Potential early markers of carcinogenesis in the mucosa of the head and neck using exfoliative cytology. *J Pathol* 1996;178:284-9.
18. Grohs HK, Zahniser DJ, Geyer JW. Standardization of specimen preparation through mono/thin-layer technology. In: Grohs HK, Husain OAN, eds. Automated cervical cancer screening. New York: Igaku Shoin; 1994. p. 176-85.
19. Fiel-Gan MD, Villamil CF, Mandavilli SR, Ludwig ME, Tsongalis GJ. Rapid Detection of HSV from cytologic specimens collected into ThinPrep fixative. *Acta Cytol* 1999;43:1034-8.