

# Citologia de base líquida associada à captura de híbridos para DNA-HPV pode otimizar a qualidade diagnóstica do método de Papanicolaou?

Could liquid based cytology associated with hybrid capture II assay for HPV-DNA optimize the cytological diagnosis?

RIALA6/983

Maria Lúcia UTAGAWA<sup>1</sup>, Sônia Maria Miranda PEREIRA<sup>1</sup>, Adhemar LONGATTO FILHO<sup>1</sup>, Cecília Roteli-MARTINS<sup>2</sup>, Luciana Silva AGUIAR<sup>1</sup>, Janaína Érika PITTOLI<sup>1</sup>, Celso DI LORETO<sup>1</sup>, Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA<sup>1</sup>, Laura MARTINS<sup>2</sup>, Janice O. GALVANE<sup>2</sup>, Kari SYRJÄNEN<sup>3</sup>.

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz<sup>1</sup>, Hospital Leonor Mendes de Barros<sup>2</sup>, São Paulo, SP - Instituto Superiore di Sanità, Roma Italia<sup>3</sup>

Recebido: 06/08/2003 – Aceito para publicação: 06/05/2003

## RESUMO

A associação da citologia de base líquida (BL) e o teste de Captura de Híbridos II (HC2) para DNA HPV poderão otimizar o diagnóstico citológico, sobretudo os de origem indeterminada (ASCUS/AGUS). Avaliamos as amostras colhidas com o sistema DNA-CITOLIQU<sup>®</sup> (DIGENE-Brasil) para citologia de BL e HC2, de pacientes atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros. Foram realizados 842 exames de citologia de BL e HC2, onde 64 (7,6%) amostras apresentaram atipias de significado indeterminado (ASCUS/AGUS) de citologia na BL. O HC2 para DNA HPV de alto risco foi positiva em 16 (25%) amostras de ASCUS e quatro (6,2%) de atipia glandular (AGUS). De 748 amostras, 88,8% foram citologicamente negativas e destas 97 (11,5%) foram positivas para HPV de alto risco. Essas alterações estão associadas à infecção pelo HPV e, portanto, colocam a paciente em um grupo com conduta diferenciada da população normal. Adicionalmente, os casos com resultados negativos no exame citológico, que nos testes de DNA HPV foram positivos, demonstraram a elevada sensibilidade das técnicas biomoleculares em relação à morfologia. Concluimos que a citologia de BL associada ao HC2, pode melhorar a sensibilidade do método de Papanicolaou.

**Palavras-Chave.** método de Papanicolaou, ASCUS, captura de híbridos, citologia de base líquida, *reflex testing*.

## ABSTRACT

Liquid based cytology and hybrid capture II assay (HC2) are thought to improve the cytological diagnosis chiefly those from undetermined origin (ASCUS/AGUS). We studied cervical samples collected with DNA CITOLIQU<sup>®</sup> System (DIGENE-Brazil) from patients referred to the Hospital Leonor Mendes de Barros, São Paulo - SP. HC2 for HPV-DNA was performed in samples from 842 women. Sixty four (7.6%) samples showed ASCUS. HC2 for high risk HPV-DNA was positive in 16 (25%) ASCUS and 4 (6.2%) AGUS. Among 748 samples, 88.8% were cytologically negative, and from these cases 97 (11.5%) were positive for high risk HPV-DNA. Consequently, women presenting negative cytology but HPV-DNA test positive, should be carefully observed, because they represent a high risk group, and their samples should be referred to a peer revision. We concluded that liquid-based cytology associated with HC2 for HPV-DNA assay may improve the sensitivity of Papanicolaou testing.

**Key Words.** Papanicolaou method, ASCUS, hybrid capture, liquid based cytology, reflex testing

## INTRODUÇÃO

O Método de Papanicolaou tem sido universalmente preconizado para o rastreamento de lesões precursoras do câncer do colo uterino<sup>17</sup>, entretanto, recentes estudos de metaanálises têm mostrado que embora o Método de Papanicolaou apresente uma alta especificidade em torno de 98%, há ainda, uma baixa e preocupante sensibilidade ao redor de 51%<sup>1,13</sup>. O elevado número de casos falso-negativos fez surgir várias propostas de melhorias no preparo e leitura de lâminas<sup>7</sup>. Equipamentos computadorizados foram desenvolvidos com a finalidade de dinamizar a leitura das lâminas; contudo o esfregão convencional, dependendo da habilidade de quem colhe a amostra, pode apresentar sobreposição de células, infiltrado inflamatório, hemácias, debris celulares e má fixação dificultando a leitura<sup>9</sup>. Partindo dessa premissa, foram desenvolvidos métodos em citologia de BL que proporcionaram o aprimoramento técnico no preparo das amostras, apresentação e melhoria na qualidade da amostra<sup>3</sup>.

A eficácia do Método de Papanicolaou passou a ser aprimorada e diferentes estudos comparativos com essa nova técnica têm mostrado seu potencial em identificar mais lesões cervicais do que o método convencional<sup>4,10</sup>. Esse potencial pode estar diretamente relacionado ao método de preparo e ao sistema adotado para estudo. Em métodos *split-sample*, onde a amostra convencional é colhida prioritariamente à de base líquida, o rendimento parece ser ligeiramente inferior aos *direct to vial*, onde há apenas a coleta em base líquida<sup>2,12,18,22</sup>. O método convencional está sujeito a múltiplos fatores que podem comprometer a qualidade de seu preparado, tais como a técnica e o instrumento de coleta, qualidade da fixação e coloração dos esfregãos<sup>14</sup>. A reprodutibilidade diagnóstica e a confiabilidade do método podem ser substancialmente melhorados com a formação profissional e educação continuada dos profissionais que realizam a leitura das lâminas<sup>23</sup>.

A premente necessidade de se melhorar a qualidade do Método de Papanicolaou fez surgir, recentemente, em nosso meio um método de citologia de base líquida, que apresenta características de preservação de DNA, RNA e proteínas, capaz de viabilizar concomitantemente o teste de captura de híbridos.

Com a disponibilidade dessa tecnologia nos propusemos a avaliar seu potencial no chamado *Reflex testing* que tem sido proposto como um mecanismo de melhoria diagnóstica incorporando aos casos diagnosticados como atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) o teste HC2 para DNA-HPV, conforme sugestão do consenso de Bethesda 2001. Esse procedimento, se utilizado de forma interpretativa, poderá levar o caso à revisão e o diagnóstico inicial de ASCUS poderá ser considerado lesão intraepitelial, posto que a dúvida seria dirimida mediante o resultado da HC2, embora o mesmo não seja aplicável ao AGUS por falta de evidências<sup>23</sup>.

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial da citologia em base líquida na identificação de lesões intraepiteliais cervicais

e correlacionar com o teste de captura híbrida para DNA-HPV de alto risco para otimização do Método de Papanicolaou.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 842 amostras cérvicovaginais de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros, participantes voluntárias do Projeto INCODEV ICA 4-CT-2001- (10013), no período de janeiro de 2002 a maio de 2003, nos quais se realizou: citologia de BL, HC2 para HPV de alto risco e biópsia.

Foi utilizado o sistema DNA -CITOLIQ (Digene-Brasil) para citologia de BL, que consiste de um kit de coleta composto por um tubete com 1ml de solução *Universal Collection Medium* (UCM) e escova. A coleta foi realizada no hospital utilizando-se a escova do kit, quebrando a haste após ter sido colocada dentro do frasco com líquido preservante. No laboratório as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 20 segundos e 200 µl foram retiradas e dispensadas sobre um conjunto de lâminas/membrana de maneira uniforme e fixadas imediatamente em álcool absoluto. A coloração utilizada foi a de Papanicolaou. Do material residual do DNA-CITOLIQ, foi retirado 75 µl para realização do HC2 para DNA-HPV de alto risco, conforme protocolo do kit de HC2. As biópsias foram coletadas nos casos em que a colposcopia apresentava alterações significativas.

## RESULTADOS

Dos 842 casos com citologia de citologia de BL e HC2 para detecção de DNA HPV de alto risco, obtivemos 16,4% (138/842) de positividade para DNA-HPV de alto risco.

Dos 7,6% (64/842) casos de atipias de significado indeterminado, 57 eram em células escamosas (ASCUS) e 7 de origem glandular (AGUS), sendo 68,7% (44/64) negativos e 31,3% (20/64) positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco. Dos 24 casos com lesão; 23 lesões intraepiteliais e um carcinoma e 75% (18/24) foram positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco. Dos 748 casos citologicamente negativos, 13% (97/748) foram positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco e 87% (651/748) foram negativos.

A Tabela 1 mostra os resultados dos 842 casos de citologia de BL e HC2 para HPV de alto risco. A Tabela 2 mostra a correlação dos resultados de casos com biópsias, HC2 e citologia de BL. Nota-se que há uma relação entre os casos com lesão e HC2 positivo.

## DISCUSSÃO

A implantação da citologia de BL associada a HC2 para DNA-HPV tem mostrado melhoria da qualidade do exame citológico. A HC2 para DNA-HPV tem sido utilizado na tentativa de se aumentar a acurácia diagnóstica da citologia. A positividade

**Tabela 1.** Correlação dos resultados de citologia de base líquida com o teste de captura II para HPV de alto risco.

CITOLOGIA	CAPTURA DE HÍBRIDOS II		TOTAL
	Negativo	Positivo	
Negativo	651	97	748
LSIL	4	11	15
HSIL	2	6	8
ASCUS	41	16	57
AGUS	3	4	7
Carcinoma Invasor	-	1	1
Insatisfatório	3	3	6
TOTAL	704	138	842

**Tabela 2.** Correlação dos resultados de casos com biópsias, captura de híbridos II para HPV de alto risco e citologia de base líquida.

Biópsia	CAPTURA DE HÍBRIDOS II							
	Negativo (n=39)		NIC 1 (n=9)		NIC 2 (n=4)		NIC 3 (n=2)	
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
Citologia								
Negativo	3	25	-	1	-	-	2	-
ASCUS	2	4	5	1	2	-	-	-
AGUS	1	1	-	-	-	-	-	-
LSIL	-	2	-	-	-	-	-	-
HSIL	-	1	2	-	2	-	-	-
Total	6	33	7	2	4	-	2	-

de HC2 para DNA-HPV oncogênico representa um risco significativo de lesão, mesmo em pacientes citologicamente negativas<sup>6</sup>. Segundo Manos e cols esta associação, conhecida como *reflex testing*, tem se mostrado eficaz podendo detectar até 50% de HPV oncogênico em séries de ASCUS ressaltando o grande impacto que esses números podem traduzir em termos de conduta e valor preditivo<sup>11</sup>. Parece-nos claro que, embora de significado impreciso pelos padrões citológicos, aceitos rotineiramente, esses casos positivos para HPV poderão ser interpretados como lesões de fato e não apenas como potencialmente suspeitos de lesão<sup>23</sup>.

Dos 64 casos de ASCUS/AGUS observados em nossa série, 20 resultados tinham HC2 positivos para HPV de alto risco, com um percentual de positividade de 31%. Ou seja, quase um terço dos diagnósticos citológicos que representam uma indefinição poderiam ser reavaliados e mais apropriadamente encaminhados à colposcopia.

Nos Estados Unidos, aproximadamente dois milhões de ASCUS são relatados por ano, uma média de 2,9% de todos os resultados citológicos cérvico-vaginais. Em alguns laboratórios esse índice pode chegar a 9%<sup>20</sup>. Em nossa série, esse índice foi de 7,6% (64/842). Embora 5% seja o índice máximo sugerido por

Bethesda<sup>18</sup> como aceitável, esse diagnóstico poderá ser otimizado com recurso de biologia molecular. O teste de Papanicolaou tem limitações inerentes a métodos de avaliação subjetiva, pois depende de observações morfológicas, o que pode causar uma variabilidade interobservadores significativa.

Em nosso estudo, testes de Captura híbrida positivos foram encontradas em 97 amostras citologicamente negativas 97/748 (12,9%) e em 20 amostras com ASCUS/AGUS 20/64 (31,2%). Esses resultados processados em conjunto poderiam otimizar o diagnóstico citológico e diminuir drasticamente os índices de falsos negativos<sup>8</sup>. Apesar disso, o real impacto da citologia BL e HC2 para DNA- HPV são baseados na avaliação histopatológica. E nessa comparação tanto a citologia de BL quanto o HC2 para DNA-HPV apresentam correlação bastante significativa com biópsias revelando que o melhor desempenho da base líquida em relação ao método convencional tem sido confirmado pela histologia<sup>4,22</sup> e pela positividade do HC2 para DNA-HPV<sup>16</sup>. Apesar da implantação da citologia em base líquida apresentar relatos de incremento diagnóstico em relação ao método convencional em programas de escrutínio<sup>5,15,21</sup>, há ainda alguns relatos que são mais resistentes em reconhecer a necessidade de conversão de um método para outro<sup>19</sup>.

As alterações morfológicas na citologia ou histologia representadas pelo coilocito que, em grande parte traduziria a expressão morfológica da infecção pelo HPV, não são específicas ou sensíveis suficientes para identificar uma infecção por HPV oncogênico e, mais frequentemente, está associada às lesões de baixo grau. Esse é um fator limitante do método citológico devendo-se reconhecer que tal limite poderá ser superado com a adição de testes biomoleculares para a identificação de HPV de alto risco<sup>17</sup>. É importante reconhecer que o HPV pode ser detectado de maneira muito confiável pelo HC2 para DNA-HPV e que os resultados podem diferir extraordinariamente em relação ao método de Papanicolaou. Atualmente o teste disponível tem mostrado um bom desempenho, com sensibilidade superior a 90% para lesões de alto grau<sup>6,16</sup>.

Recentemente, o FDA (*Food and Drugs Administration*) nos Estados Unidos aprovou o uso do chamado *DNA Pap Test*, onde a citologia em base líquida poderá ter o HC2 realizada concomitantemente<sup>8</sup>. Entre as muitas vantagens dessa estratégia está o fato de que ambos os testes oferecem um altíssimo valor preditivo negativo, o que pode dar à paciente um intervalo confiável de 5 anos entre um teste e outro.

## REFERÊNCIAS

1. Bernstein, SJ; Sanchez-Ramos, L; Ndubisi, B. Liquid-based cervical cytology smear study and conventional papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am J Obstet Gynecol**, 185: 308-317, 2001.
2. Biscotti, CV et al. Thin-layer Pap test vs. Conventional pap smear. Analysis of 400 split-samples. **J Reprod Med**, 47: 9-13, 2002.
3. Bishop JW. Comparison of the CytoRich system with conventional cervical cytology. Preliminary data on 2032 cases from a clinical trial site. 41: 15-23, 1997.
4. Bishop, JW et al. Multicenter masked evaluation of Autocyte PREP thin layer with matched conventional smears. Including initial biopsy results. **Acta cytol**, 42: 189-197, 1998.
5. Bolick, DR; Hellman, DJ. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep cervical cancer screening system. **Acta Cytol**, 42: 209-213, 1998.
6. Castle, PE et al. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. **Cancer**, 95: 2145-2151, 2002.
7. Cohn, DE; Herzog, TJ. New innovations in cervical cancer screening. **Gynecologic Surgery and Oncology**, 44: 538-549, 2001.
8. FDA News. FDA approves expanded use of HPV test. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2003/new00890.html>.
9. Ferenczy, A; Franco, E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. **Lancet-Oncology**, 2: 27-32, 2001.
10. Hessling JI et al. Effectiveness of thin layer preparations vs. Conventional pap smear in a blinded, split-sample study. Extended cytologic evaluation. **J Reprod Med**, 46: 880-886, 2001.
11. Manos, MM et al. Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **JAMA**, 281: 1605-1610, 1999.
12. Marino, JF; Fremont-Smith, M. Direct-to-vial experience with AutoCyte PREP in a small New England regional cytology practice. **J Reprod Med**, 46: 353-358, 2001.
13. McCrory, D et al. **Evaluation of cervical cytology**. Evidence Report/Technology Assessment Number 5. Duke University, 290-97-0014; Agency for Health Care Policy and Research, 99-E010. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, 1999.
14. Minge, L et al. Autocyte Prep System vs conventional cervical cytology. Comparison based on 2,156 cases. **J Reprod Med**, 45: 179-184, 2000.
15. Monsonego, J et al. Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-center study. **Br J Cancer**, 84: 360-366, 2001.
16. Petry, KU et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8,466 patients. **Br J Cancer**, 88: 1570-1577, 2003.
17. Saslow, D et al. American cancer society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. **CA Cancer J Clin**, 52: 342-362, 2002.
18. Solomon, D et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, 287: 2114-2119, 2002.
19. Sulik, SM et al. Are fluid-based cytologies superior to the conventional Papanicolaou test?. A systematic review. **J Fam Pract**, 50: 1040-1046, 2001.
20. Qudus, MR et al. Utility of HPV DNA Detection in thin-layer, liquid-based tests with atypical squamous metaplasia. **Acta Cytol**, 46: 808-812, 2002.
21. Vassilakos, P et al. CytoRich liquid-based cervical cytologic test. Screening results in a routine cytopathology service. **Acta Cytol**, 42: 198-202, 1998.
22. Vassilakos, P et al. Biopsy-based comparison of liquid-based, thin layer preparations to conventional Pap smears. **J Reprod Med**, 45: 11-16, 2000.
23. Wright Jr, TC et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. **JAMA**, 287: 2120-2129, 2000.