

DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO POR CAPTURA HÍBRIDA II: CORRELAÇÃO COM ACHADOS MORFOLÓGICOS

HPV INFECTION DETECTED BY HYBRID CAPTURE II: CORRELATION WITH MORPHOLOGICAL FINDINGS

Gerson B Dôres¹, Eliane K Taromaru¹, Cristiane G Bonomi, Adhemar Longatto Filho^{2, 3}, Nilcisa P Gilli⁴, Shiguo Matsubara⁴, José Focchi⁴

RESUMO

Introdução: o HPV é causa essencial, mas não suficiente, para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. Sua identificação é fundamental para a avaliação de risco, sendo que o método de Captura Híbrida[®] apresenta reconhecida eficácia para esse fim. Por sua vez, os métodos morfológicos, colposcopia, citologia e histopatologia, demonstram as alterações celulares e tissulares sugestivas da ação desse vírus. **Objetivo:** comparar o desempenho dos métodos morfológicos, colposcopia, citologia e histopatologia, sugestivos de infecção pelo HPV, com o teste da Captura Híbrida[®] II (CHII). **Métodos:** analisaram-se 2.871 amostras cervicovaginais consecutivas de pacientes com suspeita de infecção pelo HPV em pelo menos um dos métodos morfológicos de diagnóstico. A coleta da amostra para o estudo biomolecular foi feita conforme as recomendações do fabricante, utilizando-se a escova cervical e o STM (*specimen collection medium*) como meio de preservação, tanto para o DNA quanto para o RNA. A CHII foi realizada utilizando-se sondas complementares de RNA para *pool* de vírus considerados de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e para aqueles de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). A sensibilidade, a especificidade, a acurácia e os valores preditivos negativos e positivos dos métodos morfológicos foram determinados considerando-se o método biomolecular como padrão-ouro. **Resultados:** em 1.761 casos com diagnóstico colposcópico sugestivo de infecção pelo HPV, não se identificou a presença de DNA viral. A especificidade da colposcopia foi de 14,5%, a sensibilidade de 88,9%, a acurácia de 35,5% e os valores preditivos negativo (VPN) e positivo (VPP) de 76,9% e 29,1%, respectivamente. A citologia sugeriu corretamente HPV em 503 casos com especificidade de 56%, sensibilidade de 62%, acurácia de 57,7%, VPN de 78,9% e VPP de 35,7%. O estudo histopatológico apresentou 709 casos com suspeita de alteração HPV-induzida confirmados pela determinação biomolecular, mostrando na análise estatística especificidade de 15,1%, sensibilidade de 87,4%, acurácia de 35,6%, VPN de 75,4% e VPP de 28,9%. Juntos, os métodos morfológicos apresentaram sensibilidade de 94,1%, especificidade de 10,3% e acurácia de 34%. **Conclusão:** entre os exames morfológicos, a citologia, apesar de baixa, mostrou o melhor desempenho. A sensibilidade aumenta com a associação dos métodos morfológicos, mas, com isso, a especificidade fica reduzida e observa-se grande o número de resultados falso-positivos. Por isso, a suspeita morfológica de infecção pelo HPV deve ser confirmada por método biomolecular.

Palavras-chave: HPV, captura híbrida II, achados morfológicos

ABSTRACT

Introduction: HPV is a necessary but not sufficient cause for cervical cancer. Its crucial identifies HPV infection to establish the risk of cervical lesion. The Hybrid Capture (HCII) is recognized as method of choice to be used in routine conditions. Morphological methods (colposcopy, cytology and histopathology), are very specific to demonstrate HPV-induced lesions. **Objective:** to compare the performance of morphological methods to suggest HPV with HC II. **Methods:** 2871 consecutive samples, previously HPV infection suggested by colposcopy and/or cytology and/or histopathology, were submitted for HCII assay with high risk HPV probes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Sensitivity, specificity, accuracy and negative (NPV) and positive (PPV) predictive values were calculated taking in account the HCII results as gold standard. **Results:** we did not identified HPV infection with HCII in 1.761 cases with colposcopic diagnosis suggestive of HPV infection, The colposcopy specificity was 14.5%, the sensitivity 88.9%, the accuracy 35.5% and the Negative (NPV) and Positive (PPV) predictive values were 76.9% and 29.1%, respectively. Cytology correctly suggested HPV in 503 cases with specificity of 56%, sensitivity of 62.0%, accuracy of 57.7% and NPV and PPV of 78.9% and 35.7%, respectively. Histopathological diagnosis showed 709 cases suggestive of HPV-induced lesion confirmed by HCII, resulting in specificity of 15.1%, sensitivity of 87.4%, accuracy of 35.6% and NPV and PPV of 75.4% and 28.9%, respectively. Together, morphological methods showed a sensitivity of 94.1%, specificity of 10.3%, and accuracy of 34.0%. **Conclusion:** among the morphological methods, despite its poor performance, cytology showed the best parameters to identify HPV infection. The sensitivity, but not the specificity, was improved with the morphological methods association. By that reason, biomolecular methods are required to confirm suspected morphological HPV infection.

Keywords: HPV, hybrid capture II, morphological findings

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 17(4):255-258, 2005

INTRODUÇÃO

A história natural da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) confunde-se com a progressão das neoplasias intra-epiteliais do colo uterino. A literatura mostra que os índices de regressão, persistência e progressão são praticamente idênticos, mostrando, claramente, a

¹ Digene Brasil, São Paulo, SP

² Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

³ Universidade do Minho – Escola de Ciências da Saúde, Braga, Portugal

⁴ Lego – Laboratório Especializado em Ginecologia, São Paulo, SP

identidade comum de tais fenômenos. Pode-se dizer com segurança que há dados epidemiológicos suficientes e consistentes para afirmar que o HPV é a causa da maioria das lesões cervicais intra-epiteliais^{1,2}. De tal sorte que o correto estudo dessas alterações têm importante significado, não apenas diagnóstico mas, também, prognóstico.

Em nosso meio, a avaliação inicial ou o rastreamento de tais lesões são feitos pelo teste de Papanicolaou que, apesar das limitações com relação à sensibilidade, tem sido, até o momento, o método de eleição para grandes populações³. A colposcopia e o estudo histopatológico de biopsias dirigidas é a conduta preconizada para a confirmação diagnóstica, podendo-se, ainda, utilizar o teste de Captura Híbrida® II (CHII) quando se encontram alterações citológicas de significado indeterminado (ASCUS).⁴

Os métodos morfológicos apresentam vantagens e limitações que devem ser consideradas quando se avaliam seus resultados. A citologia tem apresentado, em diversos estudos, importantes índices de especificidade, embora, nem sempre, seja possível a correlação precisa com a histopatologia.⁵ Os métodos morfológicos, além de subjetivos e diretamente dependentes da experiência do examinador, apresentam, como desvantagem, o fato de poderem sugerir a infecção apenas quando a lesão já está estabelecida. Por isso, é oportuna a possibilidade de estabelecer a real capacidade de os métodos morfológicos identificarem a infecção pelo HPV e o impacto desse desempenho para a mulher, no dia-a-dia dos consultórios e no rastreamento populacional.

OBJETIVO

Comparar os achados sugestivos de infecção pelo HPV pelos métodos morfológicos, colposcopia, citologia e histopatologia, com os respectivos resultados biomoleculares obtidos pelo teste de CHII.

MÉTODOS

Analisaram-se 2.871 amostras cervicovaginais, consecutivas, de casos enviados a laboratório privado na cidade de São Paulo (LEGO – Laboratório Especializado em Ginecologia e Obstetrícia), para a pesquisa de DNA-HPV, provenientes de diferentes cidades e estados da federação, cujas pacientes apresentavam suspeita de infecção pelo HPV em pelo menos um dos exames morfológicos.

As amostras foram encaminhadas acompanhadas de ficha contendo número de registro e iniciais da paciente e o resultado dos exames morfológicos, que obrigatoriamente foram realizados no laboratório de origem, na forma de positivo ou negativo para HPV, não se considerando os diferentes graus de gravidade dos exames em estudo.

Os espécimes analisados foram coletados e transportados segundo as recomendações do fabricante, em tubo próprio e padrão, contendo um mililitro de STM (*specimen collection medium*, Digene Corp, Gaithersburg, MD, USA) como solução conservante, acondicionados à temperatura ambiente e o processamento biomolecular ocorreu em até 15 dias após a data da coleta.

Utilizou-se o teste de CHII para a determinação do DNA-HPV, com sondas complementares de RNA para *pool* de vírus considerados como de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e para aqueles de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Para esse tipo de determinação, cada caixa do *kit* diagnóstico permitiu 42 determinações, pois são usados nove controles, três negativos,

três positivos para o grupo viral de baixo risco e três positivos para os de alto risco. A sensibilidade do ensaio, considerando-se a amostra positiva quando a relação entre a média dos controles positivos e o espécime fosse maior ou igual à unidade, foi de 1 pg/ml, equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula. O resultado foi reportado como negativo e positivo, não se considerando os diferentes graus de positividade na dependência da carga viral.

Determinou-se a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo negativo e o valor preditivo positivo de cada um dos métodos morfológicos isoladamente considerando-se o teste biomolecular como padrão ouro. Da mesma forma, para a análise dos parâmetros acima no conjunto dos métodos morfológicos, tripé diagnóstico, considerou o caso positivo quando pelo menos um dos testes tinha resultado positivo para a infecção em estudo.

Os resultados foram plotados em tabelas de correlação 2 x 2 e os parâmetros avaliados obedeceram as seguintes fórmulas⁶:

- 1- Sensibilidade = Verdadeiro Positivo (VP)/(VP + Falso Negativo (FN)) × 100%
- 2- Especificidade = Verdadeiro Negativo (VN)/(VN + Falso Positivo (FP)) × 100%
- 3- Acurácia = (VP + VN)/(VP + VN + FN + FP) × 100%
- 4- Valor Preditivo Negativo = VN/(VN+FN) × 100%
- 5- Valor Preditivo Positivo = VP/(VP+FP) × 100%

Realizou-se o teste de Fisher para o cálculo de provável significância entre os testes e as variáveis, admitindo-se erro alfa igual ou menor que 5%.

RESULTADOS

O exame colposcópico referiu 2.482 casos com alterações sugestivas de infecção por HPV; todavia, somente em 721 deles se encontrou positividade para DNA-HPV, observando-se, dessa forma, falso-positivo em 1.761 mulheres. Por outro lado, 389 pacientes foram classificadas como negativas neste exame, mas em 90 se observou a presença de DNA do vírus. A **Tabela 1** apresenta detalhadamente a relação entre a colposcopia e a CHII.

Com relação à citologia, a infecção por HPV foi corretamente sugerida em 503 casos, e não observada em 1.153. Entretanto, em 907 casos em que se observou algum grau de alteração citológica compatível com HPV, a biologia molecular não detectou a presença viral. Em contrapartida, 308 casos diagnosticados como normal à citologia apresentavam DNA do vírus. A **Tabela 2** mostra a relação entre os dois testes e os valores das variáveis em estudo.

O estudo histopatológico dos fragmentos oriundos de biopsia dirigida apresentou 709 casos com alterações sugestivas para HPV confirmados pela CHII, deixando de reconhecer 102 positivos para DNA viral; além disso, em 1.748 casos com alguma alteração tissular morfológica, o teste de CHII foi negativo. Sob as condições propostas, a especificidade deste exame foi de 15,1% e a sensibilidade de 87,4%. A **Tabela 3** apresenta detalhadamente a relação entre os dois exames.

A **Tabela 4** apresenta a relação entre o teste de CHII e os resultados dos exames morfológicos analisados conjuntamente. Nesse cenário, há aumento da sensibilidade, que alcança índice de 94,1%, porém a especificidade decresce para 10,3%.

A **Tabela 5** mostra a análise estatística das variáveis observadas entre os testes. Como pode ser observado, entre os exames morfológicos, apesar de percentagens baixas, a citologia apresenta melhor especificidade, acurácia e valor preditivo positivo. Por sua vez, a melhor sensibilidade foi observada quando se considerou positiva a mu-

Tabela 1 - Relação entre o teste de Captura Híbrida® II e os achados coloscópicos de suspeita de infecção por HPV.

Captura Híbrida			
Colposcopia	+	-	Total
+	721	1.761	2.482
-	90	299	389
Total	811	2.060	2.871
Especificidade = 14,5%	Sensibilidade = 88,9%	Acurácia = 35,5%	VPP = 29,1%
VPN = 76,9%			

Tabela 2 - Relação entre o teste de Captura Híbrida® II e o resultado citológico de suspeita de infecção por HPV.

Captura Híbrida			
Citologia	+	-	Total
+	503	907	1.410
-	308	1.153	1.461
Total	811	2.060	2.871
Especificidade = 56,0%	Sensibilidade = 62,0%	Acurácia = 57,7%	VPP = 35,7%
VPN = 78,9%			

Tabela 3 - Relação entre o teste de Captura Híbrida® II e o resultado histopatológico de suspeita de infecção por HPV.

Captura Híbrida			
Histopatologia	+	-	Total
+	709	1.748	2.457
-	102	312	414
Total	811	2.060	2.871
Especificidade = 15,1%	Sensibilidade = 87,4%	Acurácia = 35,6%	VPP = 28,9%
VPN = 75,4%			

Tabela 4 - Relação entre o teste de Captura Híbrida® II e o resultado morfológico de suspeita de infecção por HPV.

Captura Híbrida			
Morfologia	+	-	Total
+	763	1.847	2.610
-	48	214	261
Total	811	2.060	2.871
Especificidade = 10,3%	Sensibilidade = 94,1%	Acurácia = 34,0%	VPP = 29,3%
VPN =	81,6%		

Tabela 5 - Análise dos exames morfológicos com relação às variáveis em estudo.

Tipo de Exame Morfológico					
Variável	Colposcopia	Citologia	Histologia	Todos	p
Especificidade	14,5	56,0	15,1	10,3	p < 0,000001
Sensibilidade	88,9	62,0	87,4	94,1	p < 0,0001
Acurácia	35,5	57,7	35,6	34,0	p < 0,000001
VPP	29,1	35,7	28,9	29,3	p < 0,00002
VPN	76,9	78,9	75,4	81,6	NS

lher que tivesse qualquer exame sugestivo da infecção. Todavia, esta forma de avaliação produz a pior especificidade (10,3%). Finalmente, o valor predito de negatividade não apresenta qualquer diferença entre os exames pesquisados.

DISCUSSÃO

O presente estudo revelou alguns pontos previamente descritos na literatura e que corroboram, em parte, a premissa de que os testes morfológicos não apresentam acurácia suficiente para a suspeita de infecção pelo HPV. Isso ocorre porque o diagnóstico somente pode ser feito a partir de uma lesão estabelecida. À custa disso, lesões incipientes ou ainda não existentes não são identificadas, trazendo, como conseqüência, baixo desempenho dos parâmetros de sensibilidade. Por outro lado, uma vez que há fortes e bem documentadas evidências epidemiológicas de que alguns tipos de HPV são oncogênicos em humanos⁷, é importante otimizar a sensibilidade dos métodos morfológicos para que se possa realizar a conduta apropriada nas pacientes com lesões neoplásicas e pré-neoplásicas do colo uterino.

De sua parte, os testes biomoleculares, como a captura híbrida, apresentam alta correlação com a presença de lesões de alto grau e câncer⁸.

Embora a citologia ainda seja preconizada para o escrutínio de grandes populações, a associação com a captura híbrida, sobretudo em alterações de significado indeterminado, têm apresentado crescentes evidências de seu valor prognóstico⁴. Esta associação, para o rastreamento de mulheres com 30 anos ou mais, já foi aprovada pelo FDA no ano de 2003.

Tomando-se o método biomolecular como padrão ouro para a determinação da infecção pelo HPV, os índices gerais de especificidade dos métodos morfológicos foram muito baixos, com um melhor rendimento para a citologia (56%); a sensibilidade, contudo foi a mais baixa (62%). Em geral, a especificidade e a sensibilidade apresentam índices antagonísticos. Quanto mais sensível um método, menos específico e vice-versa⁶.

Embora a colposcopia apresente a grande vantagem de ser um método de imediata informação sobre uma eventual lesão no colo uterino, apresenta baixos índices de especificidade. Neste estudo, encontrou-se especificidade de 14,5% e sensibilidade de 88,9%. Já com relação ao anatomopatológico, o que se tem observado na literatura é a mesma tendência. Mitchell *et al.*⁹ observaram, em estudo de metanálise, que a colposcopia apresenta sensibilidade de 96% e especificidade de 48% para distinguir entre tecidos normais aqueles com lesão. Esse desempenho é questionável se for considerado que a seleção da área para representação histológica pode não ser a mais representativa.

A idade das pacientes também é fator que parece influenciar a eficácia do exame colposcópico¹⁰. Analogamente, o desempenho da histopatologia também dependerá da amostra tomada na colposcopia, embora o risco de se perder um caso de neoplasia intra-epitelial não observado na colposcopia e identificado em histopatologia seja muito baixo¹¹.

O melhor desempenho global foi obtido pelo exame citopatológico. Ele mostrou melhor especificidade, acurácia e valor preditivo positivo. A citologia pode ter seus resultados otimizados quando colhida em meio de fixação, que preserve os ácidos nucléicos, as proteínas e a arquitetura celular, e preparada com a técnica de base líquida. Com essa técnica, ocorre significativa melhora na qualidade dos preparados e têm-se demonstrado excelentes índices de desempenho diagnóstico¹².

Apesar dos índices observados com o método de Papanicolaou, a melhor sensibilidade ocorreu quando da associação dos três métodos morfológicos. Juntos, apresentaram sensibilidade de 94,1%, não obstante a especificidade ter permanecido em níveis não aceitáveis, de apenas 10,3%.

Esses dados revelam que o uso desses métodos para o diagnóstico do HPV produz expressivo número de resultados falso-positivos. Com isso, mulheres são rotuladas como portadoras, quando na verdade não o são. Esse fato, além de todos os comemorativos psicossos-

ciais sobejamente conhecidos, poderá acarretar grande número de tratamentos desnecessários.

Por isso, os testes biomoleculares revestem-se de especial importância nos dias atuais. Seja para confirmar ou não o resultado de exame morfológico prévio; como poderoso teste adjuvante à citologia¹³; pelo método alternativo ao escrutínio primário, com posterior avaliação citológica dos casos positivos para HPV de alto risco, em uma estratégia de otimização de recursos e melhora diagnóstica¹⁴; e, finalmente, para o monitoramento pós-terapêutico.

É importante salientar que se deve entender o exame biomolecular para a determinação do DNA-HPV como ferramenta que avalia o real risco de a mulher desenvolver ou não as lesões precursoras e o câncer invasor do colo uterino. Cabe ao ginecologista, para orientar corretamente as pacientes e para tomar a melhor conduta terapêutica, conhecer pormenorizadamente as nuances dos resultados, principalmente no que concerne às faixas etárias e à carga viral.

CONCLUSÃO

Entre os exames morfológicos, a citologia, apesar de baixa, mostrou o melhor desempenho. A sensibilidade aumenta com a associação dos métodos morfológicos, mas, com isso, a especificidade fica reduzida e observa-se grande o número de resultados falso-positivos. Por isso, a suspeita morfológica de infecção pelo HPV deve ser confirmada por método biomolecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Östör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia – a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-192.
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-964.
- Stoler MH. New Bethesda Terminology and evidence-based management guidelines for cervical cytology findings. *JAMA* 2002; 287: 2140-2141.
- Wright TC, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287: 2120-2129.
- Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations. *JAMA* 2001; 285: 1500-1505.
- Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnosis. New York: John Wiley; 1975.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 64, Human Papillomaviruses. Lyon: IARC Monographs; 1995.
- Roteli-Martins CM. Fatores associados à neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3 em mulheres com alterações em colpocitologia e colposcopia sugestivas de infecção por papillomavirus humano. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre; 1996.
- Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortorello-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a metaanalysis. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 626-631.
- Sherman ME, Schiffman M, Cox JT, Group TA. Effects of age and human papillomavirus viral load on colposcopy triage. *J Natl Inst* 2002; 94: 102-107.
- Spitzer M, Chernys AE, Shifrin A, Ryski M. Indications for cone biopsy: pathologic correlation. *J Obstet Gynecol* 1998; 178:74-79.
- Ferenczy A, Franco E. Cervical-cancer screening beyond the 2000. *Lancet Oncology* 2001; 2: 27-32.
- Lörincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Méd* 2003; 127: 959-968.
- Clavel C, Cucherousset J, Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Nazeyrollas P. et al. Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions. *Br J Cancer* 2004; 90:1803-8.

Endereço para correspondência:
GERSON BOTACINI DAS DORES
 Rua Dr. Bacelar, 333, São Paulo, SP.
 CEP: 04026-001.

Recebido em: 03/09/05

Aprovado em: 17/11/05