

IWENS MOREIRA DE FARIA¹

VÍCTOR HUGO MELO²

LÚCIA PORTO FONSECA DE CASTRO³

FERNANDO MEIRA DE FARIA⁴

NARA DE OLIVEIRA CARVALHO⁵

ANGELA CRISTINA LABANCA DE ARAÚJO⁶

HOMERO CAPORALI DE OLIVEIRA¹

Acuidade da citologia oncótica para o diagnóstico da infecção pelo HPV no colo uterino de mulheres portadoras do HIV

Accuracy of oncotic cytology for HPV infection diagnosis on the cervix uteri of HIV-infected women

Artigos originais

Palavras-chave

Infecções por HIV
Infecções por papillomavirus/diagnóstico
Citodiagnóstico
Reação em cadeia da polimerase
Sensibilidade
Colo do útero/patologia

Keywords

HIV infections
Papillomavirus infections/diagnosis
Cytodiagnosis
Polymerase chain reaction
Sensitivity
Cervix uteri/pathology

Resumo

OBJETIVO: verificar a acuidade do exame citológico do colo uterino para o diagnóstico do HPV, comparado à reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de mulheres portadoras do HIV. **MÉTODOS:** foram incluídas 158 pacientes, sendo realizada uma primeira coleta de material da cérvix uterina com a espátula de Ayre para a PCR. A seguir, foi realizada outra coleta com espátula de Ayre e escova para a citologia oncótica. Foram revisadas 109 lâminas, tendo em vista que 49 foram destruídas, por terem ultrapassado dois anos de arquivo. **RESULTADOS:** a prevalência de HPV foi de 11% no estudo citológico e 69,7% na PCR. A idade do grupo variou de 20 a 61 anos, com mediana de 35 anos. A forma de contágio pelo HIV foi a heterossexual em 91,8% dos casos e 79,1% dos pacientes tiveram um a cinco parceiros sexuais em toda a vida. A queixa mais freqüente foi massa pélvica (5,1%) e 75,3% procuraram o serviço para consulta de rotina. A comparação de variáveis categóricas foi realizada através de tabelas de contingência sendo utilizado o teste do χ^2 com correção de Yates para comparação de proporções. Quando uma das freqüências esperadas foi menor que cinco, foi utilizado o teste de Fisher. Na comparação de testes diagnósticos foram calculados: a sensibilidade, a especificidade e razões de verossimilhança. Das 76 pacientes com HPV detectado pela PCR, somente 12 foram confirmadas pela citologia (sensibilidade=15,8%) que, por outro lado, não apresentou resultados falsos-positivos (especificidade=100%). Comparando-se os dois resultados, encontraram-se valor preditivo positivo de 100% e negativo de 33,3% para a citologia, na predição da presença do HPV. Entre as 12 pacientes com citologia positiva para HPV, quatro (33,3%) apresentaram neoplasias intra-epiteliais cervicais (OR=5,6; razão de verossimilhança positiva=infinidade positiva; razão de verossimilhança negativa=0,83). **CONCLUSÕES:** como a especificidade da citologia é bem alta, pode-se confiar no resultado positivo, ou seja, quando a citologia for positiva para o HPV, ele certamente estará presente. A baixa sensibilidade da citologia não a qualifica como exame de rastreamento para a detecção do HPV, nesse grupo de mulheres.

Abstract

PURPOSE: to verify the accuracy of uterine cervix cytology for HPV diagnosis, as compared to polymerase chain reaction (PCR) in samples of women with HIV. **METHODS:** 158 patients who had undergone a first collection of material from the uterine cervix with Ayre's spatula for PCR were included in the study. Then, another collection with Ayre's spatula and brush for oncotic cytology was performed. Only 109 slides were reviewed, as 49 of them had already been destructed for have being filed for over two years. **RESULTS:** the prevalence of HPV was 11% in the cytological exam and 69.7% in the PCR. Age varied from 20 to 61 years old, median 35 years. The HIV contagious route was heterosexual in 91.8% of the cases, and 79.1% of the patients had had from one to five sexual partners along their lives. The most frequent complaint was pelvic mass (5.1%), and 75.3% of the women had looked for the service for a routine medical appointment. The categorical variable comparison was done through contingency tables, using the χ^2 test with Yates's correction to compare the ratios. The Fisher's test was used when one of the expected rates was lower than five. In the comparison of diagnostic tests, sensitivity, specificity and similarity ratios have been calculated.

Correspondência:

Iwens Moreira de Faria
Rua Godofredo Gonçalves, 96/401 – Centro
CEP 35680-047 – Itaúna/MG
Fone: (37) 3242-3837/Fax: (37) 3242-3570
E-mail: emeira@uoi.com.br

Recebido

23/6/08

Aceito com modificações

3/9/08

Ambulatório de Ginecologia do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz e no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

¹ Pós-graduando do Programa Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

² Professor-associado do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

³ Professora-assistente do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁴ Acadêmico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁵ Bióloga do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa e Ações em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

⁶ Pós-graduanda do Programa Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte (MG), Brasil.

Among the 76 patients with HPV, detected by PCR, only 12 had the diagnosis confirmed by cytology (sensitivity=15.8%), which on the other hand did not present any false-positive results (specificity=100%). Concerning the HPV presence, the cytological prediction for positive results was 100% and 33.3% for negative, when both results were compared. Among the 12 patients with HPV positive cytology, four (33.3%) presented cervical intraepithelial neoplasia (OR=56; positive similarity ratio=positive infinity; negative similarity ratio=0.83). **CONCLUSIONS:** As the cytology specificity is quite high, it is possible to rely on the positive result, which means that a positive result will surely indicate the presence of HPV. The low sensitivity of cytology does not qualify it as a survey exam for HPV detection in this female group.

Introdução

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) pode, hoje, após mais de 20 anos de sua identificação, ser considerada a maior pandemia do século 20, com cerca de 46.000.000 de pessoas infectadas no mundo. Deste contingente de infectados, aproximadamente metade são mulheres. Esse número é 50% superior à projeção feita em 1991 pelo Programa Mundial contra AIDS, da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o final da última década do século passado¹.

No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, já foram identificados cerca de 600.000 casos da doença. O país acumulou em torno de 183.000 óbitos até dezembro de 2005, sendo as taxas de mortalidade crescentes até meados da década de 1990, estabilizando-se em aproximadamente 11.000 óbitos anuais desde 1998². De acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) de Atlanta, a síndrome é definida por uma série de condições tais como infecções oportunistas, doenças do sistema nervoso central e tumores como o sarcoma de Kaposi, linfomas primitivos do sistema nervoso central não-Hodgkin e linfomas de células B. O aumento da incidência de neoplasias cervicais no trato genital inferior de mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana induziu o CDC a incluir o carcinoma cervical entre as condições definidoras de AIDS³.

O interesse pelo HPV tem crescido constantemente desde a primeira identificação das seqüências de DNA (tipos 16 e 18) nas biópsias de câncer anogenital, tanto quanto nas linhagens do câncer cervical. Uma relação causal entre o HPV e o câncer da cérvix está firmemente estabelecida do ponto de vista epidemiológico⁴. Alta prevalência de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) em mulheres infectadas pelo HIV está bem documentada. De todo modo, pouco se sabe sobre a patogênese da doença cervical em mulheres com sorologia positiva para HIV⁵.

Pesquisando a prevalência de HPV por meio da PCR em 41 mulheres portadoras do HIV e 38 mulheres soronegativas, foi encontrada prevalência de 73% no primeiro grupo e 24% no segundo⁶. Em outro estudo, analisando resultados de PCR para o HPV de 208 mulheres infectadas pelo HIV, verificou-se que, praticamente, todas eram soropositivas para o HPV (98%), sendo que 80% delas eram infectadas por múltiplos genótipos e 90% apresentavam citologia inflamatória⁷.

Desde a implantação da triagem difundida com o teste Papanicolaou nos Estados Unidos, os índices de câncer cervical nos Estados Unidos diminuíram de 14,2 por 100.000 em 1973 para 7,8 por 100.000 em 1994. Apesar disso, o câncer cervical ainda representa a nona causa de morte por câncer entre mulheres americanas⁸. Embora os programas de triagem cervical tenham reduzido dramaticamente a incidência de câncer do colo uterino, apenas metade dos cânceres cervicais invasivos aparece em mulheres examinadas com as metodologias citológicas existentes, devido às limitações inerentes ao método⁹. Resultados de citologias falsos-positivos levam a procedimentos desnecessários e, freqüentemente, invasivos, enquanto os resultados falsos-negativos podem causar sérios danos às mulheres, assim como à saúde pública, além de implicações legais¹⁰.

A citologia é um método acessível e rápido que, teoricamente, poderia ser utilizado no rastreamento da infecção pelo HPV na população geral¹¹. Porém, a taxa apreciável de falsos-negativos e a variação dos resultados interobservador tornam necessário o uso de outros métodos complementares de diagnóstico¹²⁻¹⁴.

O objetivo do presente estudo foi verificar a acuidade do exame citológico para o diagnóstico do HPV, a partir de citologias do colo uterino de mulheres portadoras do HIV, pela comparação com o método da PCR.

Métodos

Este estudo foi aprovado pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte/Hospital das Clínicas da UFMG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG; Parecer nº 085/02). As pacientes depois de orientadas sobre a pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o cálculo amostral foi utilizado o programa Epi-Info versão 6.04 com base na prevalência da infecção pelo HPV estimada pela literatura, em mulheres infectadas pelo HIV, que varia de 75,1¹³ a 98%⁷. Calculou-se que seriam necessárias 58 pacientes. Considerando-se a possibilidade de menor prevalência de HPV cervical no grupo em estudo, foi aumentado o tamanho amostral. Assim, foram incluídas, no período de agosto de 2003 a julho de 2006, 109 pacientes soropositivas para o HIV que compareceram ao Centro de

Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) da UFMG para consulta ginecológica de rotina. Foram excluídas do estudo as grávidas, histerectomizadas, as que se recusaram a assinar o consentimento esclarecido, aquelas com impedimento para fornecer dados para o trabalho (barreiras de linguagem e desorientação) e as que tiveram suas amostras sem qualidade para detecção do HPV por meio da PCR. Todas apresentaram teste sorológico positivo para o HIV, segundo as normas da Portaria nº 488, de 17 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

O uso de drogas, fumo, comportamento sexual, número de parceiros sexuais e outras variáveis foram registrados no prontuário. Foram realizados anamnese, exame clínico e ginecológico completo. Foram colhidas amostras de todas as pacientes para a realização do estudo colpocitológico do colo uterino e para a realização da PCR para o DNA-HPV. O padrão-ouro neste estudo, para o diagnóstico do HPV, foi a PCR, por ser método de alta sensibilidade e especificidade.

Após a colocação do espéculo vaginal, antes de coletar-se o material para citologia oncológica, com auxílio de uma espátula de Ayre, fazia-se o raspado cauteloso do colo uterino. Essa espátula era quebrada, com o intuito de diminuir o seu comprimento, e colocada em um tubo de ensaio contendo, aproximadamente, 2 mL de soro fisiológico a 0,9%. O tubo era rotulado com o nome completo da paciente, número de registro no serviço e data da coleta. A seguir, o tubo era enviado ao Núcleo de Pesquisa e Ações em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da UFMG. Caso não fosse possível o envio imediato, o mesmo era armazenado em geladeira. Todo o material chegava ao laboratório em, no máximo, 24 horas.

A seguir, era coletada a citologia cervical e enviada ao Departamento de Anatomia Patológica da UFMG para ser avaliada por um único citopatologista, com padronização do laudo. A classificação adotada foi a de Bethesda (1994)¹⁵.

■ Técnica da reação em cadeia da polimerase

As amostras entregues ao NUPAD foram conservadas em geladeira a 4°C até seu processamento (24-48 h após a entrega). Com o objetivo de extrair o DNA, as amostras eram inicialmente homogeneizadas e transferidas para os tubos de Eppendorf (1,5 mL) e centrifugadas por um minuto a 14.000 rpm, para a formação do pellet. O sobrenadante era desprezado e, ao pellet, eram adicionados 200 µL de Chelex-100 a 20% (resina quelante). A mistura, após passar pelo Vortex para ser homogeneizada, ainda nos tubos de Eppendorf, foi colocada em banho seco a 100°C por 20 minutos e, posteriormente, em geladeira, até a realização da PCR.

Para a pesquisa do DNA-HPV foram utilizados dois procedimentos de PCR: o primeiro para a detecção e o segundo para a tipagem. Primeiramente, foi feito o

mix de detecção para o diagnóstico qualitativo. Quando o resultado era positivo, procedia-se à tipagem. Para a reação de detecção, foram utilizados dois pares de primers: MY09/11 e o GP5+/6+ em sistema de nested PCR.

Para controle da extração, utilizou-se um par de primers que amplifica o gene da globina: a presença da globina atesta a qualidade da amostra, ou seja, existe DNA adequado para a realização da PCR.

As amostras positivas foram tipadas para os vírus dos tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35. Para cada tipo de HPV foi utilizado um par de primers específico e, portanto, para cada amostra foram realizadas sete reações para os tipos a serem pesquisados.

■ Técnica de preparo das lâminas para o exame colpocitológico

A técnica de Papanicolaou foi o método de escolha selecionado, por fornecer morfologia nuclear fidedigna, com a clara demonstração translúcida do citoplasma. A variabilidade do corante citoplasmático, que pode estar presente nas variações hormonais das pacientes, não é uma desvantagem, desde que seja usado para avaliação o mais fidedigno índice de cariopícnose.

Procedeu-se à técnica de coloração de Papanicolaou modificada, com a utilização de hematoxilina de Harris e EA 50, para a coloração das lâminas e exame sob microscópio ótico. A hematoxilina de Harris é alume quimicamente amadurecida com óxido de mercúrio. Esta técnica geralmente é útil porque proporciona uma mancha nuclear clara. Por essa razão, tem sido usada no diagnóstico citológico exfoliativo, com a eosina contrastando com a mancha. Na rotina histológica, usa-se a hematoxilina de Harris regressivamente, mas na citologia exfoliativa pode ser usada mancha progressiva.

A hematoxilina era dissolvida no álcool absoluto e adicionada ao alume, que estava previamente dissolvido em água destilada quente, em garrafa de dois litros. A mistura era rapidamente trazida para a fervura e o óxido de mercúrio era então adicionado. A mancha era rapidamente resfriada e colocada em um frasco de água fria ou mergulhada em recipiente contendo gelo. Quando a solução estava fria, o ácido acético era adicionado e a mancha estava pronta para uso imediato. O ácido acético glacial é opcional, mas sua inclusão dá mais precisão e seletividade à mancha do núcleo. Os critérios para leitura foram: núcleo (azul); células superficiais (rosa); células intermediárias e parabasais (azul e verde)¹⁴.

Os critérios citológicos empregados para o diagnóstico de HPV foram: a presença de coilocitose e disqueratose¹⁵. Coilocitose é a alteração em células escamosas intermediárias maduras contendo um, dois ou mais núcleos discarióticos. É definida como grande cavidade ou área clara que circunda o(s) núcleo(s) proeminente(s), com bordas bem definidas. A zona periférica amíuade apresenta-se em

borrão. Discreta é a presença de células espalhadas ou em grupos tridimensionais, demonstrando pleomorfismo celular (formas caudadas ou alongadas) e/ou aumento de tamanho e, freqüentemente, hiperchromasia nuclear, sendo o citoplasma fortemente eosinofílico.

■ Marcadores imunológicos

A contagem de linfócitos T CD4+ foi realizada com o uso de anticorpos monoclonais para uso comercial e pela citometria de fluxo. O número absoluto dos linfócitos T CD4+ foi calculado baseado na contagem total de linfócitos. Foi considerado na análise o valor mais baixo da contagem de linfócitos T CD4+ mais próximo da data da coleta para PCR.

Para o método de quantificação da carga viral, foram aceitos os laudos existentes no prontuário médico, das dosagens da carga viral pelos testes: Nuclisens HIV-1 RN QT, tecnologia NASBA (amplificação de ácidos nucleicos baseados em seqüência do fabricante Organ Technika) e quantiplex HIV RNA 3.0 tecnologia bDNA (utiliza moléculas de DNA ramificadas) do fabricante Bayer. Considerou-se, na análise, a dosagem de carga viral mais alta e mais próxima da data da coleta do material cervical para PCR. As pacientes foram agrupadas segundo a classificação do CDC de 1993³.

Para a colposcopia foi utilizado o colposcópico da marca Vasconcelos, modelo padrão. A colposcopia foi realizada após aplicação de ácido acético a 3% sobre o colo uterino, com o objetivo de pesquisar áreas aceto-brancas. Após essa primeira avaliação colposcópica, o colo foi corado com solução de Schiller. Todas as áreas iodo-negativas foram estudadas, assim como a presença de pontilhado, mosaico ou outras alterações. O desenho da lesão foi registrado no prontuário de cada paciente. O passo seguinte foi a aplicação de solução de bissulfato de sódio a 5% para “descolorir” o colo. O ácido acético a 3% foi reaplicado e novamente foi realizado estudo colposcópico, com o objetivo de relacionar as áreas aceto-brancas com as áreas iodo-negativas. Foram considerados achados colposcópicos anormais: epitélio aceto-branco, pontilhado, mosaico, leucoplasia, epitélio iodo-negativo, vasos atípicos. Para classificação das lesões cervicais foi utilizada a nomenclatura proposta pelo Comitê da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia, 1990 (Roma, maio de 1990).

■ Análise estatística

As informações coletadas foram digitadas e armazenadas no Epi-Info versão 6.04 e os resultados descritivos foram da listagem e freqüência das características das diversas variáveis. A comparação de variáveis categóricas foi realizada por meio de tabelas de contingências, sendo utilizado o teste do χ^2 com correção de Yates para comparação de proporções. Quando uma das freqüências esperada foi menor que cinco,

empregou-se o teste de Fischer. Foi estabelecido erro alfa de 5% ($\alpha=0,05$), com nível de significância estatística de 95%, e erro beta de 20% ($\beta=0,20$), conferindo ao estudo um poder estatístico de 80%.

Resultados

A idade variou de 20 a 61 anos, com mediana de 35 anos e média de $35,5 \pm 8,3$ anos. A maioria possuía apenas o ensino fundamental (69,9%) e o início da atividade sexual foi aos 16 anos ou menos em 35,4% da amostra. A faixa etária para o início da atividade sexual variou entre 11 e 32 anos, com mediana de 18 anos. A forma de contágio predominante foi a heterossexual: 92,7%. O grupo de mulheres solteiras ou separadas representou 60,8% da amostra, enquanto 29,4% eram casadas e 10,1% eram viúvas. Quanto ao número de parceiros sexuais em toda a vida, 56% tiveram um a três parceiros, 36,7% tiveram entre quatro e 10 e três pacientes não informaram o número de parceiros sexuais (Tabela 1).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da PCR e da citologia para HPV em 109 lâminas estudadas. Verificou-se que a PCR foi positiva em 76(69,7%) das 109 pacientes estudadas, ao passo que a citologia foi positiva em 12(15,8%). A citologia não fez o diagnóstico em 64 pacientes (84,2%) das 76 diagnosticadas pela PCR. Não houve falsos-positivos (especificidade=100%; valor preditivo positivo=100%), sempre que a citologia foi positiva, a PCR confirmou a presença do vírus. O valor preditivo negativo (33,3%) e a sensibilidade (15,8%) foram baixos ($p=0,10$). As diferenças encontradas não foram significantes. As razões de verossimilhança encontradas foram: infinita (positiva) e 0,83 (negativa).

A comparação entre os achados sugestivos de HPV à citologia e o número de diferentes tipos de HPV identificados pela PCR, em cada amostra, não foi estatisticamente significativa. Não ficou claro se a presença de maior número de tipos de HPV possibilitaria maior acurácia aos achados citológicos definidores de HPV (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra a comparação do diagnóstico do HPV utilizando a citologia e o número de tipos de HPV identificados pela PCR, agrupados em dois ou menos e três ou mais tipos. Mais uma vez, o melhor resultado foi o da especificidade (90,3%), mas o valor preditivo positivo (41,7%) foi baixo. A sensibilidade manteve-se baixa: 13,5%. As diferenças encontradas não foram significantes ($p=0,11$).

As alterações citológicas apresentaram também baixa sensibilidade (15%) quando comparadas aos tipos de HPV, com relação ao seu potencial carcinogênico (Tabela 5). A especificidade manteve-se elevada, com predição positiva de 81,3%. As razões de verossimilhança foram muito semelhantes: 0,80 (positiva) e 0,82 (negativa). As diferenças entre os tipos de HPV não foram significantes na predição citológica ($p=0,47$).

Tabela 1 - Características demográficas e comportamentais das mulheres infectadas pelo HIV (n=109)

Variáveis	n	%
Escolaridade		
1º grau	73	69,9
2º grau	28	25,7
3º grau	4	3,7
Sem informação	4	3,7
Estado civil		
Solteira/separada	48	60,8
Casada/amasiada	32	29,4
Viúva	11	10,1
União estável	18	16,5
Tipo de trabalho		
Do lar	54	49,5
Fora do lar	53	48,6
Profissionais do sexo	1	0,9
Ignorado	1	0,9
Forma de contágio		
Heterossexual	101	92,7
Hemotransusão	1	0,9
Desconhecida	7	6,4
Número de parceiros em toda a vida		
1	15	13,8
2-3	46	42,2
4-10	40	36,7
Mais de 10	5	4,6
Desconhecida	3	2,7
Atividade sexual		
Ativa	91,7	84,2
Inativa	17,2	15,8
Uso de drogas injetáveis		
Sim	0	0,0
Não	108	99,1
Já usou	1	0,9
Tabagismo		
Sim	23	21,1
Não	71	65,1
Ex-tabagista	15	13,8

Tabela 2 - Comparação entre o diagnóstico pela colposcopia do HPV e pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

Citologia (HPV)	PCR (DNA-HPV)		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	12	0	12
Negativa	64	33	97
Total	76	33	109

Teste de Fisher: $p=0,10$; sensibilidade = 15,8%, IC95%:[9,6-27,5]; especificidade = 100%, IC95%:[86,7-100,0]; valor preditivo positivo = 100%, IC95%:[71,7-100,0]; valor preditivo negativo = 33,3%, IC95%:[24,2-43,8]; razão de verossimilhança positiva = infinidade positiva; razão de verossimilhança negativa = 0,83.

Tabela 3 - Distribuição do número de diferentes tipos de HPV identificados à PCR e o diagnóstico citológico do HPV

Número de HPV's (PCR)	Citologia		Total
	Positiva	Negativa	
Zero	0	33	33
Um	1	15	16
Dois	6	17	23
Três	3	14	17
Quatro	2	10	12
Cinco	0	7	7
Seis	0	1	1
Total	12	97	109

Tabela 4 - Comparação entre o diagnóstico colposcópico do HPV e o número de HPV's identificados pela PCR em mulheres infectadas pelo HIV

Citologia	Número de HPV's identificados pela PCR		Total
	Três ou mais	Dois ou menos	
Positiva	5	7	12
Negativa	32	65	97
Total	37	72	109

Teste de Fisher: $p=0,11$; sensibilidade = 13,5%, IC95%:[5,1-29,6]; especificidade = 90,3%, IC95%:[80,4-95,7]; valor preditivo positivo = 41,7%, IC95%:[16,5-71,4]; valor preditivo negativo = 67%, IC95%:[56,6-76,0]; razão de verossimilhança positiva = 1,39; razão de verossimilhança negativa = 0,97.

Tabela 5 - Comparação entre o diagnóstico colposcópico do HPV e os tipos virais identificados pela PCR

Citologia	Tipo de HPV identificado pela PCR		Total
	Alto risco	Baixo risco	
Positiva	9	3	12
Negativa	51	13	64
Total*	60	16	76

Teste de Fisher: $p=0,47$; sensibilidade = 15%, IC95%:[7,5-27,1]; especificidade = 81,3%, IC95%:[53,7-95,0]; valor preditivo positivo = 75%, IC95%:[42,8-93,3]; valor preditivo negativo = 20,3%, IC95%:[11,7-32,6]; razão de verossimilhança positiva = 0,80; razão de verossimilhança negativa = 0,82; *33 mulheres não apresentaram HPV e não estão incluídas nesta tabela.

Discussão

Embora a prevalência de HPV possa variar com o método de detecção utilizado, na presente amostra 67% dos casos apresentaram PCR positiva, o que não contraria estudos realizados anteriormente, também em mulheres infectadas pelo HIV, em que se encontrou a prevalência de HPV entre 75,1¹³ e 98%⁷.

Entre as 76 das 109 pacientes que participaram deste estudo com resultados positivos para HPV, 16 (21,1%) tinham infecção por apenas um tipo de HPV (infecção simples). Nas 76 pacientes com PCR positiva, o tipo de HPV mais freqüente foi o número seis, presente em 60 (78,9%) mulheres. O tipo menos freqüente foi o 18, que foi encontrado em apenas três (3,9%) mulheres.

Uma investigação sobre a prevalência do papilomavírus humano no câncer cervical, numa perspectiva mundial, detectou o HPV-DNA em 93% dos tumores,

sem variação significativa na positividade entre os países. O HPV 16 estava presente em metade dos espécimes, o HPV 18 em 14%, o HPV 45 em 8% e o HPV 31 em 5%. O tipo 6 foi predominante em todos os países, exceto na Indonésia, onde o tipo 18 foi o mais comum¹³. Em estudo prospectivo, multicêntrico, utilizando PCR, não se registraram diferenças significativas na proporção de diferentes tipos de HPV entre mulheres soropositivas e negativas para o HIV¹⁶. A infecção por tipos não identificados foi mais prevalente em ambos os grupos. Os tipos 16 e 18 estiveram presentes em 11% dos casos de HIV positivo e em 12% dos soronegativos. Os tipos 16 e 18 manifestaram-se em 21% das soropositivas e em 28% das soronegativas.

A prevalência de HPV varia com o método de detecção utilizado, sendo a infecção múltipla mais observada quando se utiliza a PCR¹⁷. As combinações mais freqüentes encontradas por esses autores foram HPV 6/11 e 16/18. Verificaram-se ainda que, em colos uterinos com lesão de baixo grau, as infecções por múltiplos tipos de HPV eram mais freqüentes, enquanto nas lesões de alto grau a infecção simples predominou. O HPV 16 foi predominante nas pacientes com carcinoma cervical. Em colos normais, o HPV 11 foi o mais freqüente.

O principal objetivo deste estudo é alcançado pela demonstração de que a PCR foi positiva em 76 (69,7%) das 109 pacientes com lâminas revisadas, enquanto a citologia foi positiva em 12 (15,8%). A citologia não fez o diagnóstico em 64 (84,2%), nas quais a PCR foi positiva (sensibilidade: 15,8%). Não houve falsos-positivos e, sempre que a citologia foi positiva, a PCR confirmou a existência do vírus. Em estudo realizado em Singapura, usando PCR como teste padrão para o diagnóstico da infecção pelo HPV, a sensibilidade dos testes para a infecção no colo uterino foi em ordem decrescente: colposcopia (85%), histologia (44%) e citologia (19%)¹⁸.

A metanálise com o objetivo de estabelecer a acuidade do exame de Papanicolaou em 28 estudos de triagem detectou sensibilidade média de 58% e especificidade média de 69%. Entretanto, enquanto a sensibilidade e a especificidade da colpocitologia em mulheres HIV positivas eram consistentes com as da população em geral, houve graves limitações ao exame como ferramenta diagnóstica, em populações com alta prevalência para NIC¹⁹.

Na comparação da hibridização molecular com a citologia, quando se usa somente a coilocitose como critério citológico, a concordância com a citologia é de 48%; quando, no entanto, esse critério é ampliado (disqueratose, discariose, binucleação ou multinucleação), a concordância se fez em 75% das vezes²⁰.

Para o diagnóstico citológico do HPV, no presente trabalho foram utilizados os critérios não clássicos, ou maiores, de Schneider. Porém, existem controvérsias na

literatura quanto ao número de critérios para o diagnóstico citológico da presença do HPV, segundo diferentes autores: para alguns, quatro ou mais critérios não-clássicos são suficientes para concluir que existe infecção pelo HPV²¹; para outros, somente a presença de dois critérios, devendo um deles ser clássico²²; outros autores, ainda, admitem que a presença de três critérios não-clássicos podem ser associados à existência do vírus²³. No nosso estudo, o diagnóstico citológico de infecção pelo HPV foi realizado quando foram encontradas as alterações consideradas maiores, com maior possibilidade de acerto do diagnóstico. Estas alterações são distintas das alterações de lesões epiteliais de baixo e alto grau, que são as displasias do epitélio, as quais podem ou não estar associadas aos efeitos morfológicos do vírus nas células. As alterações citológicas que caracterizam as displasias epiteliais são principalmente o aumento da relação núcleo/citoplasma e pleomorfismo e hiperchromasia nucleares de vários graus.

Neste estudo, as razões das probabilidades (verossimilhança) foram introduzidas para descrever o desempenho de um teste diagnóstico. Elas sumarizam o mesmo tipo de informação que a sensibilidade e a especificidade e podem ser usadas para calcular a probabilidade de doença após um teste positivo ou negativo. No entanto, a razão de probabilidades tem várias vantagens adicionais sobre a sensibilidade e a especificidade na descrição do desempenho de um teste. A informação obtida pelo teste é sumarizada em um número em vez de dois. Matematicamente, a razão de verossimilhança positiva (RVP) é calculada da seguinte maneira: sensibilidade/1 - especificidade. A razão de verossimilhança negativa (RVN) é calculada a partir da seguinte proporção: 1 - sensibilidade/especificidade²⁴.

A RVP apresentou infinidade positiva, indicando que resultado positivo tem chance praticamente total de ser verdadeiro. A RVN apresentou valor de 0,83 como probabilidade de ser uma paciente saudável. Este resultado não é confiável, por estar bastante próximo da unidade (arbitrariamente, o valor da RVN para ser confiável é definido como inferior a 0,1). A principal vantagem de terem sido obtidas neste estudo as razões de verossimilhança é que elas facilitam ir além da simples classificação do resultado de um teste como normal ou anormal e descrever sua validade apenas em termo da sensibilidade e especificidade, para um único ponto de corte. Obviamente, a doença é mais provável na presença de anormalidades extremas no resultado de um teste do que em resultados limítrofes²⁴. Outro aspecto útil da razão da verossimilhança é que, como esta pesquisa foi realizada em pacientes com alta prevalência de HPV – o que contribui efetivamente para o acerto diagnóstico e a predição positiva –, a razão de verossimilhança pode auxiliar a estimar a probabilidade pós-teste em outras populações, a partir de diferentes prevalências do HPV.

Quando se compararam os achados citológicos sugestivos de HPV com o número de diferentes tipos de HPV identificados (Tabelas 3 e 4), não foram verificadas diferenças significantes. Na literatura pesquisada não foram encontradas tais associações para permitir comparações.

As alterações citológicas apresentaram baixa sensibilidade na identificação de um ou mais tipos de HPV, com elevado potencial carcinogênico, mas com especificidade elevada na identificação de HPV de baixo risco. A RVP igual a 0,80 não aprova o diagnóstico (arbitrariamente o valor da RVP para ser confiável é definido como superior a 1,0) e a RVN igual a 0,82 sinaliza maior probabilidade de ser uma pessoa saudável, porém não é confiável, pois está próximo da unidade. Na literatura aqui pesquisada não foram encontradas tais associações para permitir comparações.

Este estudo comprova o que está estabelecido na literatura, ou seja, no rastreamento colpocitológico para o HPV, as taxas de falsos-negativos parecem ser altas. Em populações gerais, o índice de citologias falsos-negativos tem sido estimado entre 20 e 40% e isto está direcionado para as recomendações de triagem cervical, repetindo-se os esfregaços anualmente por dois a três anos e, na presença de dois resultados negativos, pode considerar-se a realização de esfregaços bianuais ou trianuais²⁵.

Os grandes e múltiplos experimentos bem controlados têm demonstrado claramente que o teste do DNA-HPV é consideravelmente mais sensível do que a citologia (tanto a convencional quanto a citologia em base líquida) e somente um pouco menos específica quando usada em mulheres de 30 anos ou mais velhas²⁶.

Recentemente, foi descoberto que as mulheres com mais de 30 anos de idade e que foram submetidas ao rastreamento para o DNA-HPV juntamente com os esfregaços de Papanicolaou apresentaram redução de 40% no risco de NIC grau II, III ou câncer, nas sessões de triagem subsequentes, quando comparadas com as mulheres que se submeteram à triagem somente com os esfregaços de Papanicolaou²⁷.

Em estudo italiano que incluiu quase 70.000 mulheres recrutadas aleatoriamente, os autores estimaram que, comparando a citologia convencional com o teste do DNA-HPV, com limite de 2 pg/mL, foi encontrado ganho estatisticamente significativo de 50% na sensibilidade,

para a detecção de NIC II e NIC III. Ao mesmo tempo, houve redução no valor preditivo positivo de somente 15 a 20%²⁸.

Em recente publicação de estudo brasileiro, os autores demonstraram sensibilidade muito baixa do teste citológico na detecção do condiloma acuminado cervical. Critérios muito importantes para o diagnóstico de LSIL ou infecção por HPV, incluindo coilocitose e células maduras muito atípicas, foram raramente vistos. Em contraste, foram detectadas, mais frequentemente, alterações citológicas menos significativas, tais como células maduras reativas, grânulos cerato-hialinos, escamas córneas, bi-nucleação e multinucleação. Esses resultados indicam que, mesmo após uma pesquisa citológica cuidadosa, os elementos principais para o diagnóstico de LSIL/HPV não estavam presentes²⁹.

Outros autores relataram os resultados de um experimento randomizado e controlado, desenhado para comparar o teste de Papanicolaou ao teste do DNA-HPV, como exames de triagem para o câncer cervical. O teste do DNA HPV foi mais sensível (39,2% de diferença – 94,6% para o teste HPV e 55,4% para o Papanicolaou) e somente 2,7% menos específico do que a citologia cervical³⁰.

Uma população específica como a deste estudo (pacientes soropositivas para o HIV) constitui um grupo especial de pacientes conhecidas por serem mais propensas à infecção pelo HPV e NIC, devido à imunossupressão. Conseqüentemente, as mulheres HIV soropositivas requerem vigilância clínica especial do seu trato genital inferior, para permitir a detecção inicial e erradicação da infecção pelo HPV e NIC. Nessa vigilância, a PCR tem se mostrado um procedimento diagnóstico mais sensível na detecção dos precursores do câncer cervical, quando comparada com a citologia.

Concluindo, a citologia mostrou especificidade de 100% para o diagnóstico de HPV, comparada à PCR, o que significa que quando a citologia foi positiva, o HPV certamente estava presente. No entanto, a baixa sensibilidade retira da citologia seu valor no rastreamento para HPV. No presente trabalho, a razão de verossimilhança positiva apresentou infinidade positiva, indicando que um resultado positivo tem chance praticamente total de ser de uma paciente acometida.

Referências

1. UNAIDS. AIDS epidemic update: December 2007 [Internet]. 2007 [cited 2008 Mar 23]. Available from: http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf
2. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Aids e DST, do Ministério da Saúde, notificados no SINAN até 30/06/2006. [Internet]. [citado 2008 Jan 12]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS9A49113DPTBRIE.htm>
3. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA*. 1993;269(6):729-30.
4. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001;286(24):3106-14.
5. Wright TC Jr, Ellerbrock TV, Chiasson ME, Van Devanter N, Sun XW. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. *Obstet Gynecol*. 1994;84(4):591-7.
6. Campos RR, Melo VH, Del Castilho DM, Nogueira CPF. Prevalência do papillomavirus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não-portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(5):248-56.
7. Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*. 2004;92(1):225-31.
8. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*. 1999;49(1):8-31, 1.
9. Cuzick J, Meijer CJ, Walboomers JM. Screening for cervical cancer. *Lancet*. 1998;351(9113):1439-40.
10. Agorastos T, Dinas K, Lloveras B, de Sanjose S, Kornegay JR, Bonti H, et al. Human papillomavirus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer. The Greek experience. *Gynecol Oncol*. 2005;96(3):714-20.
11. Hillman RJ, Ryaik BK, Botcherby M, Taylor-Robinson D. Changes in HPV infection in patients with anogenital warts and their partners. *Genitourin Med*. 1993;69(6):450-6.
12. Lorincz AT. Human papillomavirus detection tests. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparlig PF, Wiemer PJ, editors. Sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill; 1990. p. 953-9.
13. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(11):796-802.
14. Bancroft JD, Stevens A, editors. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone; 1977.
15. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria and exploratory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag; 1994.
16. Wright TC Jr, Moscarielli RD, Dole P, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Vandevanter N. Significance of mild cytologic atypia in women infected with human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol*. 1996;87(4):515-9.
17. Chang DY, Chen RJ, Lee SC, Huang SC. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia. *J Med Microbiol*. 1997;46(1):54-60.
18. Chan R, Khoo L, Ho TH, Koh CF, Lee IW, Yam KL, et al. A comparative study of cervical cytology, colposcopy and PCR for HPV in female sex workers in Singapore. *Int J STD AIDS*. 2001;12(3):159-63.
19. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol*. 1995;141(7):680-9.
20. Morse AR, Wickenden C, Byrne M, Taylor-Robinson D, Smith J, Anderson MC, et al. DNA hybridisation of cervical scrapes: comparison with cytological findings in Papanicolaou smears. *J Clin Pathol*. 1998;41(3):296-9.
21. Cavaliere MJ, Longatto Filho A, Pereira GMC, Maeda MYS, Di Loreto C. Papilomavirus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. *Bol Inf Union*. 1990;15(59-60):24-39.
22. Collaco LM, Pinto AP. Aspectos citológicos na coloração de Papanicolaou da associação de HPV com displasias e carcinoma do colo uterino. *J Bras Ginecol*. 1994;104(11/12):419-21.
23. Korobowicz E, Kwasniewska A, Georgiades I. The diagnostic value of cytomorphological traits in low and high risk type HPV infections. *Pol J Pathol*. 1997;48(2):107-12.
24. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia clínica: elementos essenciais*. 3a ed. Porto Alegre: Artmed; 1996. p. 74-5.
25. Mandelblatt J. Cervical cancer screening in primary care: issues and recommendations. *Prim Care*. 1989;16(1):133-55.
26. Wright TC Jr. Cervical cancer screening in the 21st century: is it time to retire the PAP smear? *Clin Obstet Gynecol*. 2007;50(2):313-23.
27. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(16):1589-97.
28. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Palma PD, Del Mistro A, et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(7):492-501.
29. Pinto AP, Carvalho MC, Kolb S, Tirone FA, Maia LR, Escobar CS. Value of cytology in papillary condylomatous lesions of the cervix. *Acta Cytol*. 2007;51(1):51-60.
30. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(16):1579-88.