



laboratórios

SOLUÇÕES PARA PAPANICOLAOU

- MAIOR SEGURANÇA NA COLETA DO PAPANICOLAOU;
- MELHOR VISIBILIDADE DO COLO UTERINO;
- MAIOR PRODUTIVIDADE;
- MATERIAL DESCARTÁVEL.

FONTE DE LUZ KOLPLUX



SEM FIO



APAGADO



ACESO

ESPÉCULO ILUMINADO KOLPLUX



KITS PARA PAPANICOLAOU



ESCOVA CERVICAL



FIXADOR CELULAR



TUBETE PORTA LÂMINA



ESPÁTULA DE AYRE



LÂMINA DE VIDRO



OPSIS (FORMALINA 10%)





SOLUÇÕES PARA PAPANICOLAOU

- QUALIDADE GARANTIDA;
- SEGURANÇA NA COLETA DO PAPANICOLAOU;
- BIÓPSIA SEGURA.

A scientist wearing a white lab coat, a white surgical mask, and clear safety goggles is working in a laboratory. She is wearing blue nitrile gloves and is using a pipette to transfer liquid into a petri dish. The background shows laboratory equipment and windows. A large teal overlay covers the left and center of the image, containing text.

ITENS ACESSÓRIOS

- QUALIDADE GARANTIDA;
- ENTREGA RÁPIDA;
- PREÇO COMPETITIVO.

LUVA DE PROCEDIMENTO EVA



GEL PARA ULTRASSOM



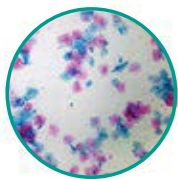
PAPEL LENÇOL



AVENTAL TNT DESCARTÁVEL PACIENTE



PROCESSADOR LÂMINAS TPK FÊNIX



LÂMINAS EM
MONOCAMADA



FILTRO PARA TPK



LÂMINA PARA
MICROSCOPIA

KIT COLETA CELLPRESERV



RACK PARA SUPORTE DA
SOLUÇÃO CELLPRESERV

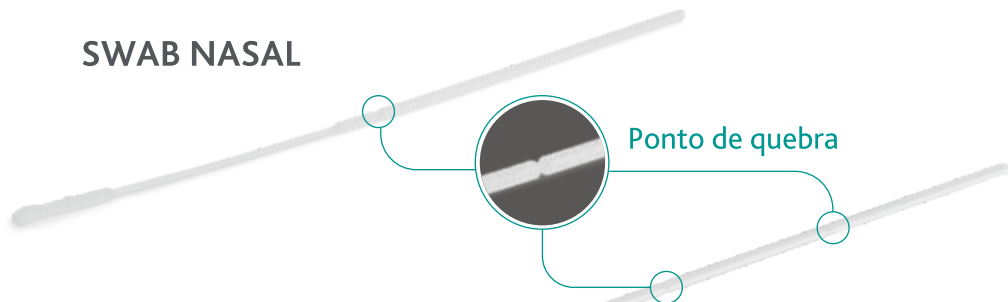
CELLPRESERV - CITOLOGIA BASE LÍQUIDA

REEMBOLSO DO CONVÊNIO (CÓDIGO 4.06.01.32-3)

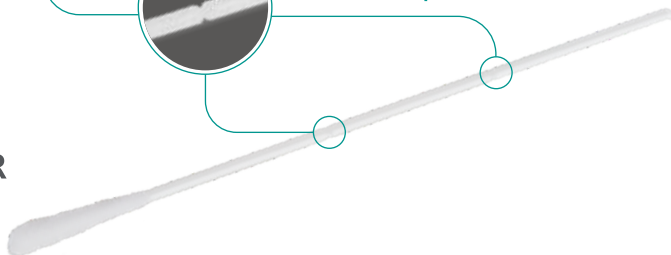
- POSSIBILITA DIVERSOS EXAMES MOLECULARES EM UMA ÚNICA COLETA;
- COMPATÍVEL COM DIVERSAS METODOLOGIAS DE BIOMOL;
- MAIOR ACURACIDADE DIAGNÓSTICA;
- PROCESSADOR DE LÂMINAS AUTOMATIZADO;
- LÂMINA COM MONOCAMADA CELULAR, LIVRE DE DEBRIS.

SWABS KOLPLAST

SWAB NASAL



SWAB REGULAR



CONJUNTO COLETA SALIVA



CONJUNTO COLETA PARA MATERIAL BIOLÓGICO

Possibilita a realização de diversos agentes infecciosos como: HPV, Clamídia, Gonococos e Perfil Trobólico, entre outros.



CONJUNTO COLETA PARA PAINEL RESPIRATÓRIO



NOVIDADE. KOLPLAGENE

Ideal para coleta e transporte de material biológico para exame genético.





COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

- QUALIDADE GARANTIDA;
- SWAB COM TECNOLOGIA FLOCK EM NYLON;
- REDUZ A CHANCE DE COLETAS INSATISFATÓRIAS.



MEIOS DE TRANSPORTE PARA MICROBIOLOGIA

- ESTÉRIL E PRONTO PARA USO;
- TUBO RÍGIDO ADEQUADO PARA O TRANSPORTE DE LONGAS DISTÂNCIAS;
- TRANSPORTE SEGURO DE AMOSTRAS CLÍNICAS.

MATERIAL CIENTÍFICO

CERTIFICATE OF REGISTRATION

VALIDATION OF NEW LOW-COST, METHANOL-BASED FIXATIVE FOR
CERVICAL CYTOLOGY AND GUMAN PAPILOMAVIRUS DETECTION

Validation of a New Low-Cost, Methanol-Based Fixative for Cervical Cytology and Human Papillomavirus Detection

Katia Ramos Moreira Leite^{a,b} Thais Silva^a Bruna Naum^a Flavio Canavez^a
Juliana Canavez^a Ruan Pimenta^{a,b} Sabrina Reis^b Luiz Heraldo Camara-Lopes^a

^aLaboratório Genoa/LPCM, São Paulo, Brazil; ^bFaculdade de Medicina da Universidade de São Paulo LIM 55, São Paulo, Brazil

Keywords

Liquid-based cytology · ThinPrep · CellPreserv · Human papillomavirus · Cervical intraepithelial neoplasia

Abstract

Objective: To test the performance of a new fixative for pap smear collection for liquid-based cervical cytology, CellPreserv[®] and compare it with the commercially available, PreservCyt[®] used in the diagnosis and detection of human papillomavirus (HPV). **Methods:** Seven hundred twenty five women participated in this study after signing an informed consent. The specimens were collected using a traditional device, agitated in PBS, and equally divided in both fixatives. The slides were prepared routinely, stained by Papanicolaou, examined blindly by 2 cytologists, and reviewed by one cytopathologist. To search for HPV, 1,000 µL from each fixative was taken and processed by polymerase chain reaction. **Results:** Considering the adequacy of samples, both fixatives had similar results - 0.33 and 0.32% of the cases unsatisfactory for PreservCyt[®] and CellPreserv[®], respectively. Considering the 701 satisfactory cases and comparing the new fixative to the traditional fixative, there was 99.3% concordance between both. The results regarding the HPV detection was

100% concordant between the 2 fixatives. **Conclusion:** The new methanol-based fixative, CellPreserv[®], is cheaper and equally efficient for treating cervical cancer screening and for HPV detection, and can be safely used by the health system prevailing in low-income countries.

© 2018 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cervical cancer is the third most frequent tumor-affecting women in Brazil, with more than 16,000 cases estimated for 2016 and 5,430 deaths registered in 2013 (inca.gov.br).

Cervical cytology is the most important preventive test for cervical cancer, responsible for a dramatic decrease in mortality.

There is discrepancy in published data, considering the superior efficiency of liquid based cytology (LBC) over the conventional cytology regarding the diagnosis of cervical epithelial abnormalities. While Siebers et al. [1] showed that there is no difference between the 2 methods, others describe better sensitivity and specificity of LBC [2–4].

Studies have shown that LBC leads to standardization in transferring collected cells and allows uniform fixation of cells, preserving their morphology, reducing blood, inflammatory cells, and mucus responsible for obscuring evaluation. Most importantly, LBC leads to a decrease in the diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) [5–7].

An additional advantage is the preservation of nucleic acids allowing additional molecular testing of human papillomavirus (HPV) and other pathogenic agents in the same collected sample [8, 9].

There are 2 main commercially available methanol-based fixatives that have been used worldwide, PreservCyt[®] from Hologic[®] and SurePath[®] from BD Diagnostics[®], but they are too expensive to be implemented by the health system of underdeveloped or developing countries due to the differences in currency and import tax rates and costs.

The possibility to develop a low cost cytology fixative in countries with restricted budgets for the prevention of cervical cancer program may allow the spreading of the LBC technology.

Our aim was to test a new methanol-based fixative produced in the country (CellPreserv[®]) by Kolplast[®] and to compare it with the currently imported PreservCyt[®] produced by Hologic[®].

Methods

Our Institutional Board approved the study in April 2016 under the protocol 051/16.

A total of 725 women voluntarily participated in this study after signing an informed consent.

The inclusion criteria were healthy women, 18 years-old or older, who spontaneously visited the outpatient care for cervical cancer prevention in a private Sao Paulo's hospital from January to September 2016.

The cervical smears were collected by a trained health professional using a traditional device that was vigorously agitated in 2 mL PBS and equally divided (1 mL each) in vials containing 20 mL of PreservCyt[®] or CellPreserv[®], the new fixative in test.

Specimens were maintained at room temperature and sent to a central laboratory that processed all samples immediately. Before the preparation of slides for cytology evaluation, 1,000 µL was taken from each sample to search for HPV by polymerase chain reaction (PCR), using a protocol previously described [10]. The DNA was extracted with QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). Amplification of the L1 conserved region of HPV was performed with primers MY09/11 (MY11-Fam-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG;MY09-CGTCCMAARGGAWACTGATC-Y = C + T/W = A + T/M = A + C/R = A + G) that detect 27 genotypes of high- (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, MM4, MM7, e MM9) and low-risk (6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, e MM8) HPV. The PCR products were

Table 1. Comparison of cytology results from 701 satisfactory cases from samples fixed in PreservCyt[®] and CellPreserv[®] solution

Results CellPreserv [®]	PreservCyt [®]						total
	negative	ASC-US	AGC	LSIL	HSIL	ASC-H	
Negative	653	3	0	1	0	0	657
ASC-US	5	18	0	2	0	0	25
AGC	0	0	5	0	0	0	5
LSIL	0	0	0	10	0	0	10
HSIL	0	0	0	0	3	0	3
ASC-H	0	1	0	0	0	0	1
Total	658	22	5	13	3	0	701

submitted to capillary electrophoresis in an ABI3730 Sanger sequencing equipment. Positivity was characterized by the presence of a 450 bp fragment using the Sanger method for identification of the virus subtype.

Since our goal was to validate the fixative, the cytology slides were prepared routinely using the ThinPrep 2000 system LBC slide processor (Hologic[®] Inc.), and the usual membrane and slides from ThinPrep[®]. The slides were stained by Papanicolaou and examined by 2 certified cytologists who were blinded and were reviewed by 1 experienced Cytopathologist using the 2014 Bethesda System for reporting cervical cytology [11].

We compared the results obtained by the 2 fixatives considering the adequacy category of satisfactory or unsatisfactory for evaluation, cytology result using Bethesda System, and HPV amplification by PCR.

Results

From 725 cases, 701 (96.7%) were satisfactory for cytological analysis by both methods. The mean age of patients was 39.7 years, ranging from 18 to 77 years.

The cytological diagnosis of specimens fixed with PreservCyt[®] and CellPreserv[®] is shown in Table 1.

The adequacy of samples was considered satisfactory, satisfactory but limited, and unsatisfactory in 436 (60.1%), 265 (36.6%) and 24 (3.3%), respectively, of samples fixed with PreservCyt[®] and 435 (60.0%), 267 (36.8%), 23 (3.2%) of samples fixed with CellPreserv[®].

Comparing the diagnosis of both fixatives, they were concordant in 99.3% of the cases. CellPreserv[®] did not detect 3 cases of ASC-US (3 cases diagnosed as negative for malignancy) and 3 cases of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL; 2 cases diagnosed as ASC-US and 1 as negative for malignancy). Both fixatives detected all cases of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) [3].

KARGER

© 2018 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/acy

Correspondence to: Dr. Katia Ramos Moreira Leite
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, LIM 55
Av. Dr. Arnaldo 455
São Paulo 01246-903 (Brazil)
E-Mail katiaramos@usp.br

Downloaded by:
133.65.173.49 IP: 133.65.173.49
133.65.173.49

2

Acta Cytologica
DOI: 10.1159/000489873

Leite/Silva/Naum/Canavez/Canavez/
Pimenta/Reis/Camara-Lopes

Downloaded by:
Norges University
133.65.173.49 IP: 133.65.173.49

Studies have shown that LBC leads to standardization in transferring collected cells and allows uniform fixation of cells, preserving their morphology, reducing blood, inflammatory cells, and mucus responsible for obscuring evaluation. Most importantly, LBC leads to a decrease in the diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) [5-7].

An additional advantage is the preservation of nucleic acids allowing additional molecular testing of human papillomavirus (HPV) and other pathogenic agents in the same collected sample [8, 9].

There are 2 main commercially available methanol-based fixatives that have been used worldwide, PreservCyt[®] from Hologic[®] and SurePath[®] from BD Diagnostics[®], but they are too expensive to be implemented by the health system of underdeveloped or developing countries due to the differences in currency and import tax rates and costs.

The possibility to develop a low cost cytology fixative in countries with restricted budgets for the prevention of cervical cancer program may allow the spreading of the LBC technology.

Our aim was to test a new methanol-based fixative produced in the country (CellPreserv[®]) by Kolplast[®] and to compare it with the currently imported PreservCyt[®] produced by Hologic[®].

Methods

Our Institutional Board approved the study in April 2016 under the protocol 051/16.

A total of 725 women voluntarily participated in this study after signing an informed consent.

The inclusion criteria were healthy women, 18 years-old or older, who spontaneously visited the outpatient care for cervical cancer prevention in a private Sao Paulo's hospital from January to September 2016.

The cervical smears were collected by a trained health professional using a traditional device that was vigorously agitated in 2 mL PBS and equally divided (1 mL each) in vials containing 20 mL of PreservCyt[®] or CellPreserv[®], the new fixative in test.

Specimens were maintained at room temperature and sent to a central laboratory that processed all samples immediately. Before the preparation of slides for cytology evaluation, 1,000 µL was taken from each sample to search for HPV by polymerase chain reaction (PCR), using a protocol previously described [10]. The DNA was extracted with QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen). Amplification of the L1 conserved region of HPV was performed with primers MY09/11 (MY11-Fam-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG; MY09-CGTCCMAARGGAWACTGATC-Y = C + T/W = A + T/M = A + C/R = A + G) that detect 27 genotypes of high- (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, MM4, MM7, e MM9) and low-risk (6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, e MM8) HPV. The PCR products were

Table 1. Comparison of cytology results from 701 satisfactory cases from samples fixed in PreservCyt[®] and CellPreserv[®] solution

Results CellPreserv [®]	PreservCyt [®]						total
	negative	ASC-US	AGC	LSIL	HSIL	ASC-H	
Negative	653	3	0	1	0	0	657
ASC-US	5	18	0	2	0	0	25
AGC	0	0	5	0	0	0	5
LSIL	0	0	0	10	0	0	10
HSIL	0	0	0	0	3	0	3
ASC-H	0	1	0	0	0	0	1
Total	658	22	5	13	3	0	701

submitted to capillary electrophoresis in an ABI3730 Sanger sequencing equipment. Positivity was characterized by the presence of a 450 bp fragment using the Sanger method for identification of the virus subtype.

Since our goal was to validate the fixative, the cytology slides were prepared routinely using the ThinPrep 2000 system LBC slide processor (Hologic[®] Inc.), and the usual membrane and slides from Thinprep[®]. The slides were stained by Papanicolaou and examined by 2 certified cytologists who were blinded and were reviewed by 1 experimented Cytopathologist using the 2014 Bethesda System for reporting cervical cytology [11].

We compared the results obtained by the 2 fixatives considering the adequacy category of satisfactory or unsatisfactory for evaluation, cytology result using Bethesda System, and HPV amplification by PCR.

Results

From 725 cases, 701 (96.7%) were satisfactory for cytological analysis by both methods. The mean age of patients was 39.7 years, ranging from 18 to 77 years.

The cytological diagnosis of specimens fixed with PreservCyt[®] and CellPreserv[®] is shown in Table 1.

The adequacy of samples was considered satisfactory, satisfactory but limited, and unsatisfactory in 436 (60.1%), 265 (36.6%) and 24 (3.3%), respectively, of samples fixed with PreservCyt[®] and 435 (60.0%), 267 (36.8%), 23 (3.2%) of samples fixed with CellPreserv[®].

Comparing the diagnosis of both fixatives, they were concordant in 99.3% of the cases. CellPreserv[®] did not detect 3 cases of ASC-US (3 cases diagnosed as negative for malignancy) and 3 cases of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL; 2 cases diagnosed as ASC-US and 1 as negative for malignancy). Both fixatives detected all cases of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) [3].

Table 2. Comparison of cytology results in 36 HPV positive cases from 725 cases collected

	HPV positive cases					
	negative	ASC-US	AGC	LSIL	HSIL	ASC-H
PreservCyt [®]	23	5	1	5	2	0
CellPreserv [®]	25	5	1	3	2	0

The results regarding the HPV detection was 100% concordant between the 2 fixatives. From 701 specimens tested by HPV, 36 (5.1%) were positive, and all cases were satisfactory for cytological evaluation by the 2 fixatives. From HPV positive cases, the cytological results are presented in Table 2. From 36 HPV positive cases, cytology was negative in 23 (63.9%) of cases using PreservCyt[®] and in 25 (69.4%) cases collected in CellPreserv[®]. The HPV genotypes in negative cytology were HPV6 [7], HPV18 [6], HPV16 [3], and 1 of each HPV11, HPV33, HPV45, HPV52, HPV58, HPV61, and HPVMM7. Considering the 13 HPV positive cases with abnormalities in cytology using Thinprep[®] fixative, the viral genotype was HPV58 [3], HPV16 [3], HPV18 [2], HPV70 [1], HPV39 [1], and HPVMM7 [1]. In 2 cases, it was not possible to subtype the virus due to technical reasons. Considering viral subtype and cytology findings, HPV58 positive cases were diagnosed as LSIL [2] and ASC-US [1]. HPV16 were diagnosed as LSIL [2] and HSIL [1]. HPV18 was diagnosed as ASCUS and HSIL. HPV70 and MM7 were both diagnosed as ASC-US. The diagnosis was Atypical Glandular Cells for HPV39.

Discussion

Expenses for the public health system are the main concern in the establishment of cervical cancer screening programs. Cost-effectiveness studies address that the better performance of LBC reducing the number of false-negative test results, and the number of unsatisfactory specimens may be interesting, allowing larger intervals for screening, from 3 to 5 years [12]. Low-income countries have, by definition, lower productivity and underdeveloped industrialization, making it difficult to develop new methods that could be to be applied for cancer screening. Our goal with this study was the validation of a methanol-based new fixative for LBC produced in the country as a substitute of a traditional imported fixative for cervical cancer screening. The purpose is to turn the

method economically affordable for underdeveloped or in developing countries, since the commercially available products are expensive due to the currency value and costs related to the import process.

Considering the fixative PreservCyt[®] used in this validation study, the costs related to the fixative alone is 40% higher than that produced internally, turning the universal use of LBC by public prevention of cervical cancer program economically unviable.

Our results show that the performance of CellPreserv[®] is similar to that of the PreservCyt[®], with concordance higher than 99%. There were only 4 false-negative cases, representing 0.57%. One case was diagnosed as LSIL and 3 as ASC-US by PreservCyt[®]. Five (0.7%) cases were false-positive cases, all diagnosed as ASC-US in PreservCyt[®] fixative.

Co-testing using the combination of Pap cytology plus HPV DNA testing is the preferred cervical cancer screening method for women who are 30-65 years old since it is cost effective and would be ideal for the large-scale healthcare public programs [13].

We have shown that HPV test was positive in a significant number of negative cytology cases using both fixatives, 23 with PreservCyt[®] and 25 with CellPreserv[®]. The similar number means that both are similar in the preservation of the viral genome and have no PCR interfering substances. This is one of the most important findings of our study, since literature shows that this method is more effective in preventing cervical cancer and some countries are planning to substitute cytology for DNA HPV testing for cervical cancer screening programs.

One of the advantages of the method mentioned in this study is that the comparison of the result was made between patients in one group and not in between patients of 2 different groups. On the other hand, the previous collection in PBS and posterior division between the 2 fixatives would compromise the adequacy of the sample mainly related to a smaller number of cells. However, it seems that it was not the case, since we had a small number of unsatisfactory cases related to cellularity. In addition, PBS could influence the appearance of cells; although it would be the same alteration in both split samples, it did not happen, being the cytological aspect preserved in all samples.

The majority of papers compare LBC with conventional Papanicolaou smear [2, 4, 14]. There are few studies comparing different methods of LBC. Published studies have shown better performance of SurePath[®] over Thinprep[®] in the detection of significant lesions [15, 16]. However, ours is the first study addressing the perfor-



VALIDAÇÃO PROPOSTA

Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de Perfil de Trombofilia por Biologia Molecular

TÉCNICO RESPONSÁVEL: Fernanda Dahrouge Chiarot – CRBM: 10628 e Patricia Thoman – CRBM: 20957

CONCLUSÃO:

- O coletor CellPreserv® (Kolplast) foi validado para a detecção por PCR em tempo real utilizando os kits TaqMan SNP Genotyping Assays específicos para Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298, **desde que a extração do DNA das amostras seja realizada após a centrifugação dos escovados e a subsequente substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2 antes do procedimento de extração.**
- Em experimentos anteriores a esta validação, quando as amostras coletadas em CellPreserv® (Kolplast) foram extraídas diretamente sem o passo de substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2, o desempenho do DNA extraído na detecção do Perfil de Trombofilias não foi satisfatório. Logo, parece existir algum componente na formulação do CellPreserv® (Kolplast) que torna obrigatória a substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2.

VALIDAÇÃO PROPOSTA

Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Herpes Virus Tipo 1*, *Herpes Virus Tipo 2* e *Trichomonas vaginalis* por Biologia Molecular

TÉCNICO RESPONSÁVEL: Fernanda Dahrouge Chiarot – CRBM: 10628 e Patricia Thoman – CRBM: 20957

CONCLUSÃO:

- O coletor CellPreserv foi validado para a detecção por PCR em tempo real utilizando os kits Microbial DNA qPCR Assays específicos para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Herpes Simples 1* e *Herpes simples 2*.
- Embora em um primeiro momento os ensaios de *Ureaplasma urealyticum* e *Herpes simples 2* tenham apresentado discordância para amostras cervico-vaginais



positivas e DNA sintético, respectivamente, foi possível aprovar a detecção destes dois alvos pelas seguintes razões: 1) não é possível excluir a possibilidade de que a *Ureaplasma urealyticum* presente no primeiro grupo de amostras testadas tenha se degradado ao longo do tempo (as amostras foram coletadas há mais de um mês); 2) não é possível excluir a possibilidade de que houvesse algum tipo de inibidor do pool de amostras cervico-vaginais positivas que atuou apenas no sistema de PCR em tempo real da *Ureaplasma urealyticum* (que não estava presente ou estava presente mais diluído quando foram testadas apenas amostras positivas para este alvo no segundo experimento); 3) existe a possibilidade de que o DNA sintético utilizado como controle para o *Herpes Simples Tipo 2* seja mais frágil e não suporte as diversas etapas de lise, aquecimento, lavagem e eluição da extração automatizada, o que inviabilizou a detecção do mesmo nos dois experimentos realizados. Entretanto, a detecção dos dois patógenos funcionou com amostras cervico-vaginais, que mimetiza melhor o que ocorrerá no dia-a-dia, permitindo a validação dos mesmos para o coletor CellPreserv.

- O objetivo destes experimentos foi visualizar se o coletor CellPreserv possuía em sua composição algum componente que atuasse como inibidor das reações de PCR em tempo real utilizadas para detectar estes alvos específicos, impedindo portanto a sua utilização na coleta de amostras cervico-vaginais para a detecção destes alvos. Este resultado não foi evidenciado pelos experimentos realizados.
- O coletor CellPreserv não foi validado, neste momento, para a detecção por PCR em tempo real utilizando o kits *Microbial DNA qPCR Assays* específico para *Trichomonas vaginalis*. Por ser um protozoário delicado, mais experimentos são necessários para definir as condições ideais para validar este coletor para este uso.

VALIDAÇÃO PROPOSTA

Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de Perfil de Trombofilia por Biologia Molecular

TÉCNICO RESPONSÁVEL: Fernanda Dahrouge Chiarot – CRBM: 10628 e Patricia Thoman – CRBM: 20957

CONCLUSÃO:

- O coletor CellPreserv® (Kolplast) foi validado para a detecção por PCR em tempo real utilizando os kits TaqMan SNP Genotyping Assays específicos para Fator V de Leiden, Fator II Protrombina, MTHFR 677 e MTHFR 1298, **desde que a extração do DNA das amostras seja realizada após a centrifugação dos escovados e a subsequente substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2 antes do procedimento de extração.**
- Em experimentos anteriores a esta validação, quando as amostras coletadas em CellPreserv® (Kolplast) foram extraídas diretamente sem o passo de substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2, o desempenho do DNA extraído na detecção do Perfil de Trombofilias foi muito prejudicado. Logo, parece existir algum componente na formulação do CellPreserv® (Kolplast) que torna obrigatória a substituição do meio de preservação por PBS pH 7,2.

#00013

INCIDENCE OF CERVICAL LESIONS ASSOCIATED WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN WOMEN LIVING IN TRIBUTARY COMMUNITIES OF AMAZONAS RIVER - BRAZIL

M. Zonta¹, K. Bonilha¹, M. Shuio¹, B. Otta¹, C. Kiffer².
¹Santo Amaro University (Brazil), ²Federal University of São Paulo (Brazil)

Background / Objectives

Introduction: Cervical cancer remains a world public health problem. The relationship between this neoplasia and human papillomavirus infection is well established. In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) predicts that there will be 16,300 new cases of the disease in 2018. There are no reports of cases about this neoplasm in the riverine populations of the Amazon River and its tributaries, leaving this population deprived of medical assistance and programs of cancer prevention.

Objective: The present work aims, by using a liquid-based cervical cytology followed by a Human Papillomavirus (HPV) genotyping, to identify the incidence of HPV infection, a precursor lesion of cervical cancer, in cervical samples from women living in the riverside of Negro and Madeira River.

Methods

Method: 123 cervical samples were collected in a liquid medium (Cellpreserv) and automatically processed on KLP 2000 equipment (Kolplast[®]). Two cytologists analyzed the cellular material subjected to conventional Papanicolaou staining and classified the results by Bethesda System (2011). The HPV genotyping was performed using the MicroArray (Euroimmun[®]) method in duplicate. Data were analyzed statistically by the Mann-Fisher exact test and the chi-square test. The study was duly approved by the Ethics Committee of the Santo Amaro University - SP (Brazil Platform - CAAE: 61414216.4.0000.0081).

Results

Results: Of the 123 cellular samples, 65 samples were from Negro River riverside population and among of them 12.32% showed squamous intraepithelial lesions with neoplastic potential such as ASCUS (1.54%), LSIL (6.15%) and HSIL (4.62%). The highest incidence of HPV types were 16, 45, and 61 (21.43%). Others 58 cellular samples were from Madeira's riverside population and 6.7% showed cervical intraepithelial lesions with neoplastic potential, of them ASCUS (1.72%), LSIL (1.72%) and HSIL (3.45%) The incidence of HPV infection, in both regions, was 31 (25.20% samples analyzed by molecular test, being HPV 16 (4,87%) and HPV 45 and 53 (3,25%) the most prevalent types. The highest incidence of HPV infection was in women aged less than 25 years (43.75%) and over 50 years (27.27%), compared to women aged between 26 and 49 years ($X^2=9.64$ $p=0.0081$). Viral infection was more frequently found among single women than married women ($p=0.0412$).

Conclusion

Conclusion: Our results showed a high risk of developing cervical neoplasia in young and single women due to the great incidence of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) associated with HPV types of high oncogenic risk found in women living in the riverside communities near the Madeira and Negro River, tributaries of the Amazon River.

References

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase N°5, version 2.0, IARC Press. Lyon; 2004.
Duarte- Franco E, Franco EL. Cancer of the the uterine cervix. BMC Women's Health 2004; 4: S13.

INCA. Sistema de câncer de base populacional [on-line]. 2007 [citado em 2007 24 de Julho]. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/cgi/sisbasepop.asp>
Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM [Online]. 2007 [citado em 24 de Julho de 2007]. Disponível em: URL: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. J Infect Dis 1999; 180: 1415-23

Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EL, Sherman ME, Thomsen BL, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in Young woman: population based prospective follow up study. BMJ 2002; 325-572.

Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE, Franco EL. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12: 1029-37.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte Franco E, Rohan T, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15: 1274-80.

Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al. Early natural history of incident, type-specific human papillomavirus infections in newly sexually active young women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2011;20(04):699-707

Moore MA, Tajima K. Cervical cancer in the asian pacific-epidemiology, screening and treatment. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(04):349-361

Vieira RC, Monteiro JdoS, Manso EP, et al. Prevalence of typespecific HPV among female university students from northern Brazil. Infect Agent Cancer 2015; 10:21

BRASIL, National Institute of Cancer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, 2011.

G. N. L. Camara, D. M. Cerqueira, A. P. G. Oliveira, E. O. Silva, L. G. S. Carvalho, and C. R. F. Martins, "Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the federal district of Brazil," Memórias do Instituto Oswaldo

Cruz, vol. 98, no. 7, pp. 879-883, 2003.



VALIDAÇÕES CELLPRESERV – APLICAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO MEIO DE COLETA NA ROTINA DE EXAMES DO LABORATÓRIO IPOG.

VALIDAÇÃO PROPOSTA

Validação do Desempenho de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de Genotipagem HPV 36 tipos virais por Metodologia Flow Chip

TÉCNICO RESPONSÁVEL: Fernanda Dahrouge Chiarot – CRBM: 10628

CONCLUSÃO:

- O coletor **CellPreserv® (Kolplast)** demonstrou um ótimo desempenho no exame de **Genotipagem HPV 36 tipos virais - Metodologia Flow Chip**, nenhum dos 50 casos testados apresentaram resultados inválidos pelo motivo de PCR inibida.
- Concluímos com essa validação que nenhum componente químico do kit de coleta **CellPreserv® (Kolplast)** interfere na reação de PCR do exame de **Genotipagem HPV 36 tipos virais - Metodologia Flow Chip**.
- É importante, em um próximo momento, uma validação para a confirmação dos resultados obtidos, avaliando a sensibilidade e especificidade, para que o kit **CellPreserv® (Kolplast)** seja aceito para o exame **Genotipagem HPV 36 tipos virais - Metodologia Flow Chip**.

VALIDAÇÃO PROPOSTA

Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de Papilomavírus Humano (HPV) e Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) por Métodos de Biologia Molecular

TÉCNICO RESPONSÁVEL: Fernanda Dahrouge Chiarot – CRBM: 10628 e Patricia Thoman – CRBM: 20957

CONCLUSÃO:

- Os valores de kappa de todas as análises estão na faixa compreendida entre 0,60 e 1,0 que indica uma concordância boa a ótima entre os resultados de cada par de técnicas avaliadas. Os valores de kappa obtidos para a detecção de HPV de alto risco, CTNG e HPV de baixo risco foram, respectivamente: 0,745; 1,0 e 0,634.
- A validação de amostras cérvico-vaginais coletadas em coletor CellPreserv apresentou concordância levemente maior para a detecção de Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (100%) do que para a detecção de HPV (88 a 94%).

- O desempenho da metodologia cobas 4800 (PCR) foi levemente melhor do que o desempenho da Captura Híbrida para a detecção de HPV, de acordo com a taxa de sensibilidade apresentada pelas duas técnicas (89% da PCR contra 80% da Captura Híbrida). Entretanto, este ganho de sensibilidade da metodologia PCR foi acompanhado por uma pequena perda na taxa de especificidade, quando comparada com a metodologia de Captura Híbrida (88% da PCR contra 93% da Captura Híbrida). Assim, verifica-se que enquanto a Captura Híbrida teve dificuldade em identificar os indivíduos não infectados pelo HPV (VPN de 88% da Captura contra 93% da PCR), a PCR teve dificuldade em identificar indivíduos verdadeiramente infectados pelo HPV (VPP de 80% da PCR contra 89% da Captura). Estes dados refletem os dados de literatura disponíveis quando as duas técnicas foram comparadas em outros estudos.**

- O desempenho da metodologia cobas 4800 (PCR) foi semelhante ao da Captura Híbrida para a detecção de CT/NG, de acordo com as taxas de sensibilidade e especificidade apresentada pelas duas técnicas (100%). Assim, verifica-se que tanto a Captura Híbrida quanto a PCR identificou muito bem indivíduos infectados e não infectados pela CT/NG, (taxas de VPP e VPN em 100%).

- Deve-se ressaltar nesta validação que houveram algumas amostras discordantes entre as duas técnicas, sendo que para a detecção de HPV de alto risco oncogênico 2 amostras resultaram positivas para Captura Híbrida e negativas na PCR Cobas e 4 amostras resultaram positivas para PCR Cobas e negativas para Captura Híbrida. Para a detecção de HPV de baixo risco oncogênico, 1 amostra resultou positiva para Captura Híbrida e negativa para PCR in house e 2 amostras resultaram positivas para PCR in house e negativas para Captura Híbrida.

- Algumas considerações devem ser feitas: seria interessante verificar os laudos citológicos das amostras que originaram resultados negativos por Captura Híbrida e positivos por PCR, pois há uma diferença de sensibilidade das técnicas que deve ser avaliada. Por exemplo, a Captura origina um resultado positivo apenas com número superior a 5000 cópias virais enquanto que a PCR origina um resultado positivo com apenas 50 cópias virais presentes na amostra. Assim, pode haver uma tendência da técnica da PCR resultar positiva quando as alterações citológicas ainda não estão presentes na amostra, ao passo que a Captura Híbrida só ira resultar positiva se houverem também alterações citológicas presentes na amostra.

- Outra diferença que deve ser levada em consideração na análise destas amostras é o fato da metodologia da PCR de alto risco detectar o HPV-66, que é um tipo de HPV que não é identificado pela técnica de Captura Híbrida. Além disso, a PCR in house validada pelo IPOG não detecta o HPV-43, que está presente na sondas da Captura Híbrida de HPV de baixo risco oncogênico. Assim, poderia ser interessante submeter estas amostras a uma outra técnica de genotipagem de HPV, como a CLART HPV (BIOMERIEUX) ou a Papillocheck (GREINER) para verificar se o HPV presente nestas amostras é o HPV-66 ou HPV-43.

- Além disso, as amostras coletadas em coletor CellPreserv necessitaram de um processo de centrifugação prévio antes do processamento da Captura Híbrida. Este processo, denominado de conversão, implica no descarte do sobrenadante do meio e na ressuspensão do pellet em meio STM (QIAGEN) e do reagente de desnaturação. Não excluir as hipóteses de perda de pellet ou de precipitação de algum componente do meio ou da amostra que esteja interferindo na reação de Captura Híbrida.



- Já foi descrito em literatura que até 5% das amostras testadas tanto pela técnica de Captura Híbrida quanto pela técnica de PCR para a detecção de HPV podem apresentar resultado positivo para Captura Híbrida e negativo para PCR, como em 3 casos que ocorreram nesta validação, do qual o resultado foi repetido em ambas as técnicas e confirmado.***

- No caso da detecção de CT/NG, a taxa de resultados discordantes foi inexistente, mas deve ser levado em consideração que a grande maioria das amostras eram negativas.

- Em suma, a utilização do coletor CellPreserv para a detecção de HPV e CT/NG pelo sistema cobas 4800 (PCR) e de HPV de baixo risco por PCR *in house* atendeu aos critérios previamente dispostos: apresentou um valor de concordância correta (acurácia) elevado (compreendido entre 88% e 100%, dependendo do tipo de análise), uma taxa de concordância incorreta baixa (compreendida entre 6% e 12%, dependendo do tipo de análise) e valores do índice Kappa compreendidos entre as faixas boa e ótima (0,60 a 1,00).

- Logo, a utilização deste meio para as técnicas de biologia molecular de Captura Híbrida e PCR Cobas 4800 para detectar HPV de alto risco oncogênico e CTNG e de PCR *in house* para detecção de HPV de baixo risco pode ser indicada imediatamente.

Referências Bibliográficas

- hc2 HPV DNA Test – Ensaio de hibridização de ácidos nucleicos *in vitro* com amplificação de sinal que utiliza a quimioluminescência das microplacas para a detecção qualitativa de 18 tipos de DNA de papilomavírus humano (HPV) de baixo e alto risco em amostras cervicais - Instruções de Utilização – QIAGEN 2008.

- Cobas 4800 HPV Test – Instruções de Utilização – ROCHE 2013.

- ** Comparison of the accuracy of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction in detecting clinically important cervical dysplasia: a systematic review and metaanalysis**

Hung N. Luu¹, Kristina R. Dahlstrom², Patricia Dolan Mullen³, Helena M. VonVille⁴ and Michael E. Scheurer^{1,5,*}

Article first published online: 21 APR 2013

DOI: 10.1002/cam4.83

- *** Multiple human papillomavirus infection in ASC-H and HSIL lesions in women with cervical biopsies and comparison between Cobas 4800 HPV and Hybrid capture High-risk 2 Test**

1Xavier Cateau (M.D), 2Michel Péteïn (Ph.D), 3Michel Vanhaeverbeek (Ph.D), 1Jean-Christophe Noël (Ph.D)

1Unit of Gynaecopathology, Pathology Department, Erasme's University Hospital-Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

2Institute of Pathology and Genetics, Gosselies, Belgium.

3Laboratory of Experimental Medicine, Centre Hospitalo-Universitaire de Charleroi, André Vésale Hospital-Université Libre de Bruxelles, Montigny-Le-Tilleul, Belgium.

Submitted: September 9, 2012

Accepted: September 30, 2012

Published: October 16, 2012



São Paulo, 08 de abril de 2021.

Adendo – Complementação: Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv-Kolplast® para Detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR.

Conclusão:

- Concluímos que o meio coletor CellPreserv-Kolplast®, está validado para uso como meio coletor para o exame SARS-CoV-2 pela metodologia de RT-PCR;
- Amostras coletadas em CellPreserv-Kolplast® e acondicionadas em temperatura ambiente por **até 15 dias** não demonstraram nenhum sinal de degradação do material genético do vírus SARS-CoV-2, preservando assim, mesmo em condições não indicadas para outros meios de coleta, a presença e detecção do vírus com eficiência;
- Nos testes realizados não houve interferência e inibição na reação por RT-PCR tempo real. Todos os controles internos das reações foram amplificados, dentro dos valores esperados do ensaio, demonstrando assim que a reação apresentou uma performance adequada;

Fernanda Dahrouge Chiarot

Responsável técnica

CRBM: 10628



São Paulo, 08 de abril de 2021.

Validação de Amostras Coletadas de Saliva no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv-Kolplast® para pesquisa de Perfil de Trombose

Conclusão:

- Concluímos que o coletor CellPreserv-Kolplast®, está validado para uso do exame de Perfil de Trombose pela metodologia de PCR tempo real em amostras coletadas em saliva;
- Amostras coletadas em CellPreserv-Kolplast® e acondicionadas em temperatura ambiente por até 7 dias não demonstraram nenhum sinal de degradação do material genético;
- Nos testes realizados não houve interferência e inibição na reação de PCR tempo real. Todas amostras apresentaram a detecção do seu DNA genômico e as reações dentro dos valores esperados do ensaio, demonstrando assim que a reação apresentou uma performance adequada;

Fernanda Dahrouge Chiarot
Responsável técnica
CRBM: 10628



São Paulo, 08 de abril de 2021.

Validação de Amostras Coletadas de Saliva no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv-Kolplast® para pesquisa de Intolerância à Lactose

Conclusão:

- Concluímos que o coletor CellPreserv-Kolplast® apresentou 100% de concordância entre amostras coletadas em sangue total EDTA e amostras colhidas de saliva no coletor CellPreserv-Kolplast®;
- A coleta de saliva em coletor CellPreserv-Kolplast® está validado para uso do exame Intolerância à Lactose pela metodologia de PCR tempo real;
- Amostras coletadas em CellPreserv-Kolplast® e acondicionadas em temperatura ambiente por até 7 dias não demonstraram nenhum sinal de degradação do material genético;
- Nos testes realizados não houve interferência e inibição na reação de PCR tempo real. Todas amostras apresentaram a detecção do seu DNA genômico e as reações dentro dos valores esperados do ensaio, demonstrando assim que a reação apresentou uma performance adequada.

Fernanda Dahrouge Chiarot
Responsável técnica
CRBM: 10628

GRUPO kolplast



+55 11 4961.0900

vendas@kolplast.com.br

www.kolplast.com.br