

Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**Ana Salomé Tavares
Pereira**

**Genotipagem do vírus do Papiloma Humano em
citologia cérvico-vaginal**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**Ana Salomé Tavares
Pereira**

**Genotipagem do vírus do Papiloma Humano em
citologia cérvico-vaginal**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Céu Figueiredo, Professora auxiliar, Faculdade de Medicina do Porto e co-orientação da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Aos meus filhos

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientadora

Professora Doutora Maria do Céu Fontes Herdeiro Figueiredo

Professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Arguente convidado

Mestre Susana Maria de Melo Pereira Guimarães

Assistente hospitalar no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João

Co-orientador

Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desta Tese de Mestrado, os meus reconhecidos agradecimentos:

À Professora Doutora Céu Figueiredo, orientadora científica desta Tese de Mestrado, agradeço em primeiro lugar a disponibilidade com que aceitou ser minha orientadora, a oportunidade de usufruir das suas inquestionáveis qualidades científicas e humanas e a amizade demonstrada ao longo desta caminhada. Muito obrigada.

À Professora Doutora Fátima Carneiro, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, muito agradeço a pronta disponibilização de condições para a concretização desta Tese.

À Técnica coordenadora Dr^a Filomena Lima, e a Técnica subcoordenadora Dr^a Helena Pereira, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, agradeço o entusiasmo com que me apoiaram neste projecto e a amizade com que sempre me honraram, nestes anos de convívio. Muito abrigada.

À Professora Doutora Adelaide Almeida, co-orientadora desta Tese agradeço a disponibilidade demonstrada em todos os momentos.

À Dr^a Patrícia Pontes e agradeço a inestimável colaboração científica na obtenção de resultados moleculares e toda a sua disponibilidade e palavras de apoio.

À Dr^a Sónia Sousa agradeço a inestimável colaboração científica na obtenção de resultados moleculares e toda a sua disponibilidade e palavras de apoio.

Agradeço a todos os elementos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, as palavras de apoio que sempre expressaram, em especial às minhas amigas Bárbara e Cristina por todo o apoio e carinho demonstrado.

À Dr^a Susana Guimarães agradeço a disponibilidade e amizade demonstradas ao aceitar o convite para arguente convidada desta tese de Mestrado. Muito obrigada.

Agradeço às minhas amigas de todas as horas Mariana, Manuela e Sandra, de uma maneira especial, por todo o carinho e inestimável amizade demonstrada ao longo deste já nosso longo percurso em conjunto. Muito obrigada.

Por fim muito agradeço aos homens da minha vida, o meu marido Albino o companheiro de todas as horas a sua paciência em momentos menos bons e aos meus filhos Simão e Afonso todo o orgulho demonstrado neste projecto da mãe.

Palavras-chave

Papilomavirus humano, Métodos de genotipagem, Citologia cérvico-vaginal, Cancro do colo do útero

Resumo

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais frequente, sendo a sua prevalência muito alta em todo o mundo. A infecção persistente por HPV de alto risco é causa necessária para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e cancro do colo do útero.

O objectivo desta Tese foi comparar, numa amostra de base hospitalar composta por citologias cérvico-vaginais positivas por captura híbrida para HPV de alto risco, três métodos de genotipagem de HPV, o PapilloCheck® HPV Genotyping, o Seeplex® HPV18 ASE Genotyping e o Digene® HPV Genotyping RH Test. Foi ainda objectivo deste trabalho esclarecer se a capacidade de detecção dos diferentes métodos de genotipagem do HPV varia com o diagnóstico citológico.

Os resultados mostraram heterogeneidade entre os três métodos na detecção da infecção por HPV (variando entre os 73,3% e os 79,2%), na capacidade de detectar infecções múltiplas (variando entre os 41,1% e 58,7%) e na capacidade de detecção de tipos específicos de HPV. O desempenho de cada método de genotipagem foi avaliado após a definição de genótipos consenso para cada um dos tipos de HPV de alto risco comuns aos três métodos. Da comparação dos resultados individuais de cada teste com o genótipo consenso, verificou-se que o PapilloCheck® apresentou deficiente capacidade de detecção do HPV 16 (72%), enquanto que o Seeplex® e o Digene® mostraram sensibilidades de detecção de 100%. O Seeplex® teve a pior performance na detecção do HPV 18 (33%) e do HPV 45 (0%). O Seeplex® e o Digene® têm capacidade semelhante de detecção do HPV 16 e do HPV 31 nos diferentes grupos citológicos. Pelo contrário, o PapilloCheck® falha a detecção de 50% dos HPV 16 nas citologias normais e nas lesões de ASC-US e de 60% dos HPV 31 nas citologias normais. O método Digene® foi o único que detectou com 100% de sensibilidade o conjunto de HPV de alto risco responsáveis pela grande maioria dos casos de carcinoma invasor, independentemente da presença e tipo de lesão citológica.

Globalmente, os resultados obtidos reforçam a necessidade de que os métodos de genotipagem do HPV sejam robustos, fiáveis e com sensibilidade e especificidade elevadas de modo a poderem vir a ser utilizados quer como primeira linha no rastreio primário, quer como no seguimento clínico de mulheres com alterações citológicas.

Keywords

Human papillomavirus, Genotyping methods, Cervical cytology, Uterine cervix cancer

Abstract

HPV infection is the most common sexually transmitted disease and the virus has a very high prevalence worldwide. Persistent infection with high-risk HPV is a necessary cause for the development of precancerous lesions and cancer of the cervix.

The aim of this Thesis was to compare, in a hospital-based sample of cervical cytologies hybrid capture-positive for high-risk HPV, three methods of HPV genotyping, PapilloCheck® HPV Genotyping, Seeplex® HPV18 ASE Genotyping and Digene® HPV Genotyping RH Test. An additional aim was to elucidate whether the performance of the different genotyping methods changed with the cytology diagnosis.

Results have shown heterogeneity between the three methods regarding the capacity of detecting HPV (ranging from 73.3% to 79.2%), the detection of multiple HPV infections (ranging from 41.1% to 57.8%), as well as in the ability to detect specific HPV types. The performance of each genotyping method was evaluated by defining consensus HPV genotypes for each HPV high-risk type commonly detected by all three methods. Comparisons between the results of each individual method with the consensus genotypes revealed that whereas Seeplex® and Digene® had 100% sensitivity in detecting HPV 16, PapilloCheck® had only a detection rate of 72%. Seeplex® had the worst performance in detecting HPV 18 (33%) and HPV 45 (0%). Seeplex® and Digene® had 100% detection rates for HPV 16 and HPV 31 in the different groups of lesions. In contrast, PapilloCheck® misses 50% of HPV 16 in normal cytologies and in ASC-US and 40% of HPV 31 in cases with normal cytology. Digene® was the only method that detected with 100% sensitivity the group of high-risk HPVs responsible for the great majority of the invasive carcinoma cases, independently of the cytology diagnosis.

Globally, these results reinforce the need for robust, reliable, sensitive and specific HPV genotyping methods for use as a first line in primary screening as well as in the clinical follow-up of women with cytological alterations.

Abreviaturas

AGC-NOS	Células glandulares atípicas
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
FDA	“Food and Drugs Administration”
HC2	Captura Híbrida 2
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesões intra-epiteliais de alto grau
IARC	“International Agency for Research on Cancer”
LCR	“Long Control Region”
LSIL	Lesões intra-epiteliais de baixo grau
ORF	“Open Reading Frame”
P53	“Protein 53”
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase chain reaction”
pRB	Proteína do retinoblastoma
RNA	“Ribonucleic acid”

Lista de Figuras

Figura 1.....	12
Figura 2.....	13
Figura 3.....	14
Figura 4.....	16
Figura 5.....	17
Figura 6.....	26
Figura 7.....	27
Figura 8.....	28
Figura 9.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1.....	31
Tabela 2.....	31
Tabela 3.....	33
Tabela 4.....	34
Tabela 5.....	35
Tabela 6.....	36
Tabela 7.....	37
Tabela 8.....	38
Tabela 9.....	38

Índice

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	11
1.1 Papiloma vírus humano e cancro do colo do útero	11
1.1.1 Epidemiologia do cancro do colo do útero.....	11
1.1.2 Epidemiologia da infecção por HPV	12
1.1.3 Estrutura básica e genoma do HPV	13
1.1.4 Ciclo de vida do HPV e transformação maligna	15
1.1.5 O HPV no cancro do colo do útero e suas lesões precursoras.....	17
1.1.6 Co-factores na evolução do cancro do colo do útero.....	18
1.2 Prevenção e detecção do cancro do colo do útero	19
1.2.1 Citologia.....	19
1.2.2 Métodos moleculares	20
CAPÍTULO II - OBJECTIVOS	23
CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material.....	25
3.2 Métodos.....	25
3.2.1 Captura Híbrida (HC2)	25
3.2.2 PapilloCheck [®]	27
3.2.3 Seeplex [®] HPV18 ASE Genotyping.....	27
3.2.4 Digene [®] HPV Genotyping RH test.....	28
3.2.5 Análise estatística	29
CAPÍTULO IV - RESULTADOS.....	31
4.1 Avaliação dos métodos de genotipagem	31
4.2 Relação entre métodos de genotipagem e alterações citológicas.....	35
CAPÍTULO V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	39
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

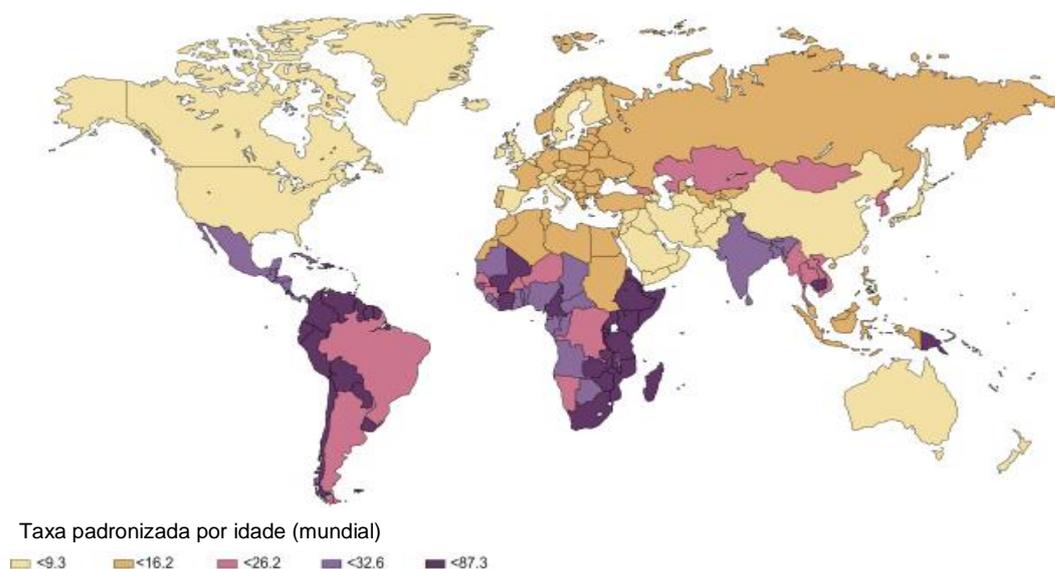
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 Papiloma vírus humano e cancro do colo do útero

O conceito de que agentes infecciosos poderiam estar envolvidos na patogénese do cancro do colo do útero remonta a meados do século XIX. Domenico Rigoni Stern descreveu que, mulheres com frequentes contactos sexuais com vários parceiros, tinham um risco maior de desenvolver cancro do que mulheres que não tinham relações sexuais. Desde então, os agentes sexualmente transmissíveis que poderiam explicar esta característica epidemiológica foram amplamente investigados. Foi no final da década de 1970 que os primeiros indícios verdadeiramente importantes permitiram delinear a patogénese do cancro do colo do útero. Em 1976, Harald zur Hausen publicou a sua hipótese de que o cancro do colo do útero e respectivas lesões precursoras poderiam ser causadas por agentes semelhantes aos que causam, no trato genital, o condiloma acuminado ou verrugas genitais (1). A descoberta da implicação do papiloma vírus humano (HPV) como causa do cancro do colo do útero valeu-lhe, em 2008, o Prémio Nobel em Fisiologia e Medicina. Posteriormente, foram utilizadas sondas para procurar sequências de DNA do HPV em amostras de cancro do colo do útero e novos tipos de HPV, tais como o HPV 16 e 18, foram associados à carcinogénese (2, 3).

1.1.1 Epidemiologia do cancro do colo do útero

O cancro do colo útero é uma importante causa de morbilidade e mortalidade a nível mundial e um problema de saúde pública. É o segundo cancro mais incidente em mulheres, sobretudo nos países em desenvolvimento (4). A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, na América central e sul, África e Ásia (sul e sudoeste), onde a taxa de incidência ajustada para a idade é de aproximadamente 17,8 por 100.000 mulheres. (5) Nos países desenvolvidos, a incidência é mais baixa, de cerca de 9,0 por 100.000 mulheres (Figura 1).

**Figura 1**

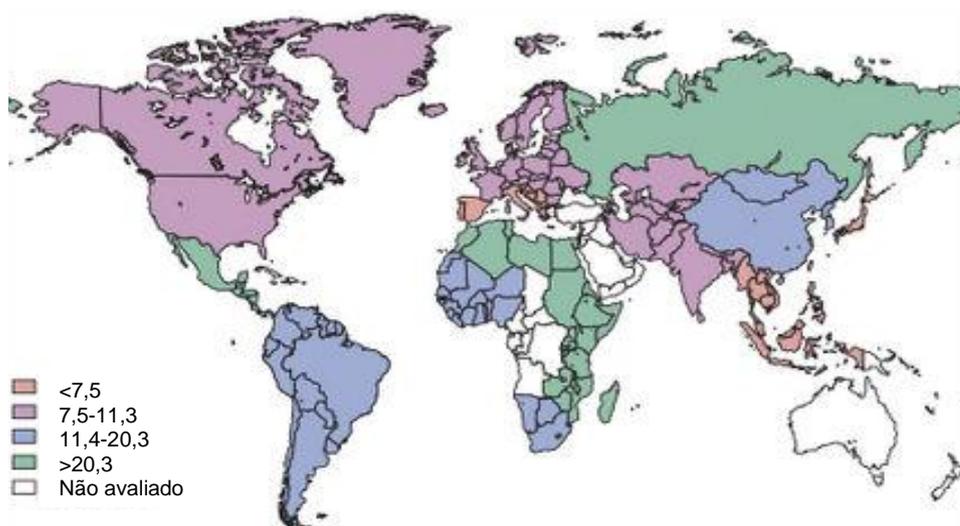
Incidência mundial de cancro do colo do útero em 2002. Adaptado de Vaccine, 24: 12, 2006.

Em Portugal, a taxa de incidência de cancro colo do útero é de 12,2 novos casos por 100.000 mulheres por ano e a taxa de mortalidade é de 3,6 por 100.000 (5). Assim o cancro do colo do útero é, em Portugal, o 4º tipo de cancro mais frequente e a 5ª causa de morte por cancro nas mulheres (6).

1.1.2 Epidemiologia da infecção por HPV

A infecção por HPV é considerada como a doença sexualmente transmissível mais frequente no mundo. Isto porque apresenta um padrão típico de transmissão sexual, dependente de hábitos pessoais, como por exemplo, o número de parceiros sexuais e a frequência de contacto sexual com parceiros que tenham tido contacto sexual com outros parceiros (7).

A infecção por HPV apresenta dois picos de maior prevalência. O primeiro grupo é constituído por mulheres jovens (18-25 anos) que adquirem o HPV logo após o início da actividade sexual. O segundo grupo situa-se entre a quarta e quinta década de vida, por aquisição de um novo tipo de HPV (8, 9, 10).

**Figura 2**

Prevalência mundial do HPV. A infecção por HPV ocorre em todo o mundo, mas existem diferenças significativas na prevalência entre países. Geralmente, a prevalência é maior nos países das regiões em desenvolvimento, do que nos países desenvolvidos. Adaptado de Lancet Infect Dis. 207: 453-459, 2007.

Estima-se que a prevalência mundial da infecção por HPV seja de 10,4% havendo diferenças significativas na prevalência entre os países (Figura 2) (11).

A transmissão do vírus ocorre por contacto com a pele ou mucosas infectadas, principalmente por via sexual. A maioria das mulheres infectadas não apresenta sintomas clínicos, e em cerca de 90% dos casos, a infecção regride espontaneamente (12).

1.1.3 Estrutura básica e genoma do HPV

O HPV pertence à Família *Papillomaviridae* e ao Género *Papillomavirus*. O vírus possui uma cadeia dupla de DNA circular com aproximadamente 8 mil pares de bases. A cápside vírica é icosaédrica, com um diâmetro de 50 a 60 nm, sem revestimento lipídico (13).

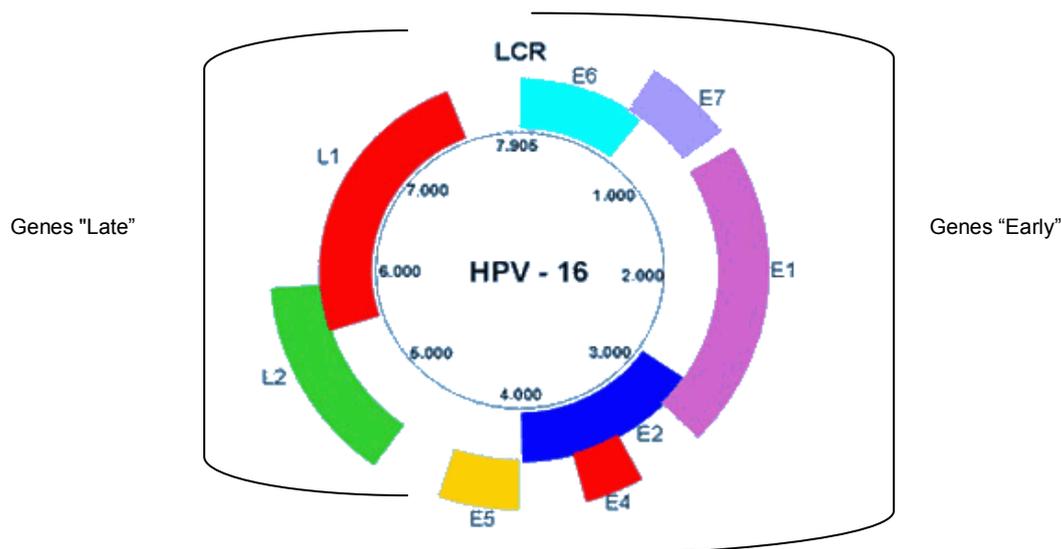


Figura 3

Mapa do genoma do HPV 16". LCR "Long Control Region".
Adaptada de www.sppv.org/images/hpv_genome.gif em 2010.

O genoma do HPV é pequeno e, na sua estrutura, podem ser consideradas três regiões (Figura 3). A região não codificante, também designada por "Long Control Region" (LCR), contém a origem de replicação e a maioria dos promotores de transcrição; a região "Early", composta pelos E1, E2, E4, E5, E6 e E7; e a região "Late", que contém os genes L1 e L2. Os genes E1 e E2 codificam respectivamente as proteínas E1 e E2, que regulam a replicação do DNA viral, assim como a expressão de proteínas virais. Por outro lado, os genes E6 e E7 que codificam as proteínas E6 e E7, são responsáveis pela transformação da célula hospedeira. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas estruturais que irão constituir a cápside vírica (14, 15).

Existem mais de 100 tipos de HPV, sendo que, apenas 40 infectam o tracto anogenital (16). Baseados na associação com o carcinoma do colo do útero e nas suas lesões precursoras, os tipos de HPV podem ser divididos em alto e baixo risco. Os genótipos de alto risco incluem os HPV de tipo 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 e associam-se a risco elevado de desenvolvimento de cancro do colo do útero. Os genótipos de baixo risco incluem os tipos HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 61, 72 e 81 e são frequentemente encontrados em lesões benignas (17).

1.1.4 Ciclo de vida do HPV e transformação maligna

As infecções transitórias pelo HPV são bastante comuns em mulheres jovens e sexualmente activas. A maioria destas infecções é assintomática e cura-se espontaneamente, sendo que apenas uma minoria das mulheres infectadas irá desenvolver infecção persistente.

A infecção inicia-se na camada basal do epitélio do colo do útero. Para tal, o vírus precisa de aceder a esta localização, possivelmente por perda de integridade da mucosa do colo útero ou pela existência de micro-erosões ou traumatismos (18).

À medida que se dividem, as células basais e parabasais migram em direcção à superfície e tornam-se diferenciadas. Na divisão, as células infectadas distribuem o DNA do HPV. Uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece indiferenciada na camada basal (18). Nesta fase inicial, os genes “Early” são expressos e o genoma do HPV é replicado. Na maior parte dos casos, o genoma do vírus encontra-se e é replicado sob a forma episomal, resultando daí uma proliferação de células infectadas (infecção latente). Nas camadas superficiais do epitélio os genes L1 e L2 são expressos, dando-se depois a montagem da cápside. Desse modo, são formadas as partículas virais (HPV) que são libertadas, podendo então o vírus iniciar uma nova infecção (19).

Em alguns casos, geralmente associados à transformação maligna, pode haver integração do genoma vírico no genoma da célula hospedeira (Figura 4) (19). A integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro, leva à sua linearização entre os genes E1 e L1 e à inactivação do gene E2, por corte ou deleção no momento da integração. O gene E2 codifica uma proteína repressora responsável pela regulação dos genes E6 e E7. A inactivação do gene E2 no momento da integração viral provoca uma expressão descontrolada de E6 e E7 (20, 21).

As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 são responsáveis pelo potencial carcinogénico do HPV, pois têm capacidade de formar complexos com as proteínas p53 e pRB da célula do hospedeiro, levando à sua degradação. Como consequência da inactivação da p53 pela proteína viral E6, as células tornam-se resistentes à apoptose. Além de impedir a apoptose, a E6 mantém activas

algumas cinases e activa também a telomerase, permitindo que as células se mantenham em divisão (22). A proteína viral E7, leva à degradação da pRB, que na sua forma activa está ligada ao factor de transcrição E2F, impedindo a proliferação celular. A E7 ultrapassa este controlo do ciclo celular, levando à libertação do E2F, com consequente expressão de proteínas necessárias para manter as células em divisão. Como consequência da interacção entre proteínas víricas e humanas, a apoptose diminui e a proliferação aumenta, aumentando também a possibilidade de acumulação de mutações e o risco de transformação maligna (23, 24, 25).

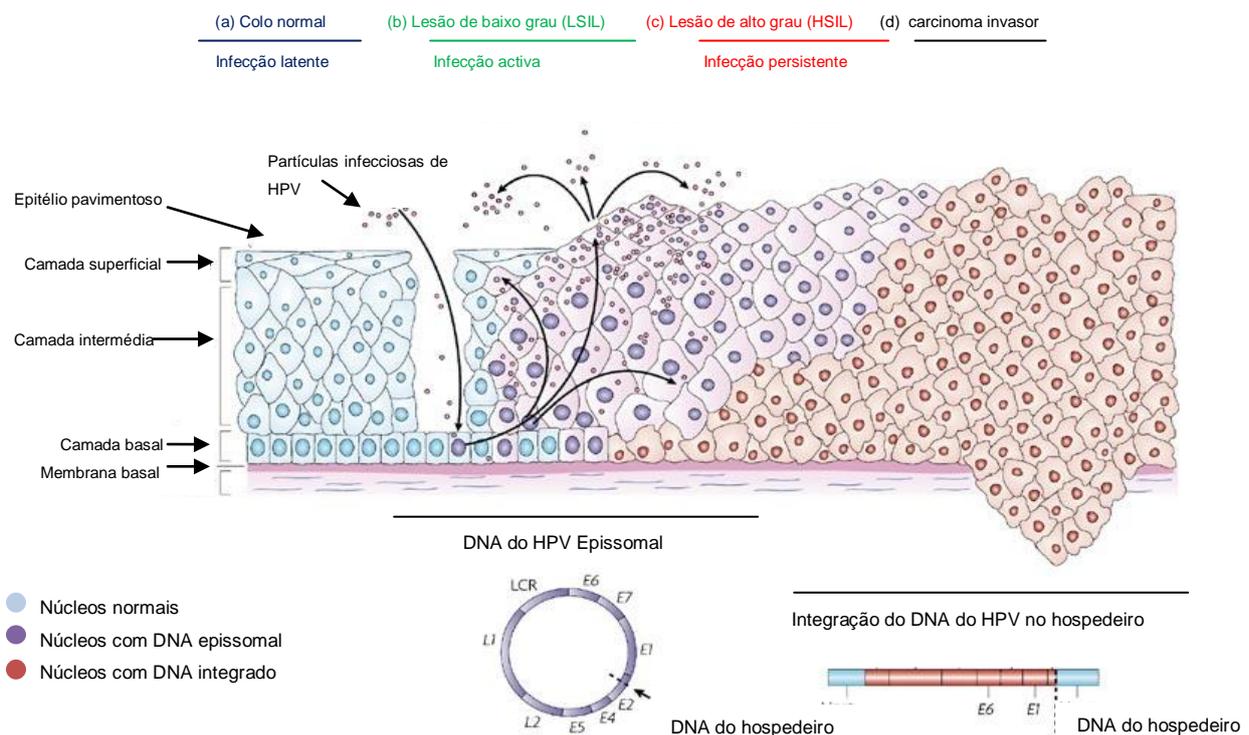


Figura 4

Representação do ciclo de vida do HPV e a sua associação com o processo de carcinogénese do colo do útero. (a) epitélio pavimentoso estratificado normal do colo do útero; (b) fase inicial da infecção e lesões de baixo grau em que o DNA do HPV se encontra na forma episossomal; (c e d) fase em que o DNA do HPV já se encontra integrado no DNA do hospedeiro, aumentando o risco de lesões de alto grau e de carcinoma invasor. Adaptado de Nature Reviews Cancer 7, 11-22, 2007.

1.1.5 O HPV no cancro do colo do útero e suas lesões precursoras

A maioria dos casos de carcinoma do colo do útero são carcinomas de tipo epidermóide, apesar de o número de casos de adenocarcinoma ter vindo a aumentar nas duas últimas décadas (12). Os carcinomas epidermóides são resultado da progressão, através de estadios não invasivos, que podem ser distinguidos morfológicamente (Figura 5). Assim, estas lesões pré-malignas podem ser classificadas através de vários sistemas. O sistema de classificação em neoplasias intra-epiteliais (CIN) considera as lesões de CIN I, CIN II e CIN III, que reflectem a proporção do epitélio pavimentoso que se encontra com alterações citológicas induzidas pelo vírus (26). O Sistema de Bethesda (27) considera as lesões intra-epiteliais escamosas (SIL) de baixo grau (LSIL) e de alto grau (HSIL). As lesões de LSIL correspondem geralmente às de CIN I e têm baixo risco de progressão para doença invasiva. As lesões de HSIL, correspondem às de CIN II e CIN III e têm risco aumentado de progressão para carcinoma invasor (Figura 5).

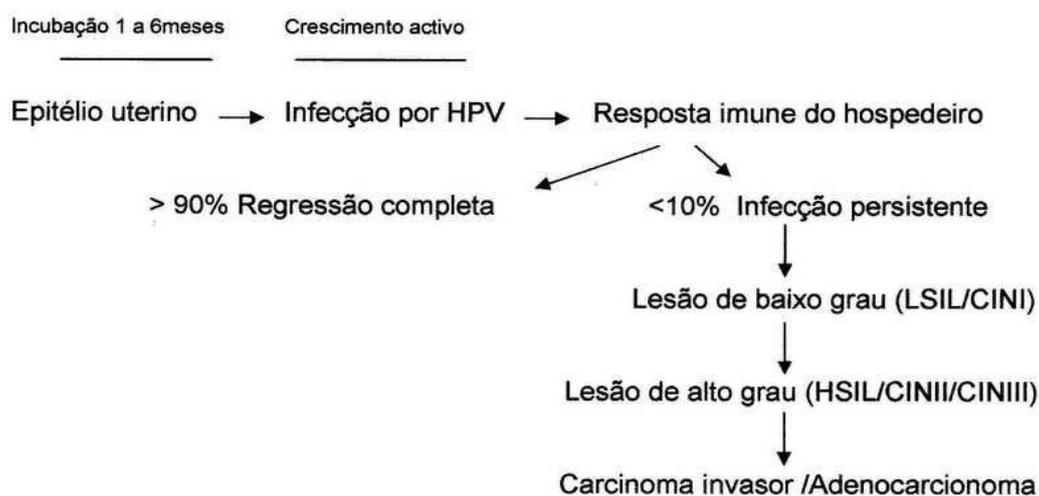


Figura 5
Representação da evolução da infecção por HPV

Dos cerca de 40 tipos de HPV identificados no tracto genital, 90% a 100% podem ser identificados em amostras de cancro do colo útero (7). A incidência da infecção por HPV de alto risco situa-se entre 3 e 25% da população feminina. As infecções por HPV de alto risco geralmente duram vários meses e na maioria dos casos regridem espontaneamente sem causar lesões clínicas relevantes (28). Os tipos de HPV 16 e 18 encontram-se em cerca de 70% de todos os cancros do colo do útero, enquanto que, entre as mulheres saudáveis, são mais frequentes os restantes tipos de HPV. Assim, as mulheres infectadas com o HPV 16 ou HPV 18, têm um risco aumentado de desenvolver lesões precursoras de alto grau ou carcinoma invasivo, quando comparadas com mulheres infectadas com outros tipos de HPV de alto risco (29).

Sendo o HPV 16 o mais prevalente a nível mundial nos cancros do colo do útero (50% a 60%), seguido pelo HPV 18 (10% a 12%) (7), estes dois em conjunto contribuem para mais de 50% das infecções detectadas em lesões intra-epiteliais de alto grau (30). Os HPV 31 e 45 têm também uma prevalência significativa no cancro do colo do útero de cerca de 4% a 5%. O HPV 16 é identificado com maior frequência nos carcinomas epidermóides (67%), enquanto o HPV 18 está associado ao adenocarcinoma (36%). O conjunto dos HPV 16, 18, 31, 45 e 33 são responsáveis por 80% dos carcinomas epidermóides do colo do útero (7). Por sua vez, o conjunto dos HPV 16, 18, 45, 59 e 33 são responsáveis por 94% dos adenocarcinomas do endocolo (7). De qualquer forma, e apesar de mais representados nas lesões de alto grau e no carcinoma invasor, os HPV de alto risco 16, 18, 45, 59 e 33 têm uma prevalência de cerca de 45% em amostras de citologia normal (7).

1.1.6 Co-factores na evolução do cancro do colo do útero

Apesar da infecção por HPV ser condição necessária para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, a presença da infecção não é suficiente. Como tal, vários outros factores têm sido apontados como possivelmente importantes para a carcinogénese do colo do útero. O uso de contraceptivos orais foi considerado pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) (31) como factor de risco para desenvolvimento de cancro do colo do útero, quando usados por tempo

prolongado, por mulheres infectadas com HPV de alto risco. A influência das hormonas na carcinogénese do colo do útero não está bem estabelecida e estudos sugerem que estas podem promover a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro, com a consequente desregulação da expressão de E6 e E7 (31). Constatou-se ainda, que existe uma associação directa entre o número de gestações e o risco aumentado de cancro do colo do útero. Os estados nutricional e hormonal, traumatismos e mecanismos imunológicos são hipóteses plausíveis para explicar a associação entre a multiparidade e o cancro, podendo estar relacionados com a persistência da infecção, ou com a evolução para lesões pré-neoplásicas (32). O consumo de tabaco está também associado com o risco aumentado de cancro do colo do útero, permanecendo por esclarecer se aumenta o risco de infecção ou a persistência da infecção por HPV (33). Estudos do IARC mostraram ainda que o risco de cancro do colo do útero aumenta quando as mulheres, além de estarem infectadas por HPV, têm co-infecções com *Chlamydia trachomatis*, herpes vírus tipo 2 e vírus da imunodeficiência humana (31, 34).

1.2 Prevenção e detecção do cancro do colo do útero

1.2.1 Citologia

Desde que, em 1941, Papanicolaou introduziu o estudo das células do colo útero em esfregaços cérvico-vaginais (35), a citologia tem sido o método mais usado como primeira abordagem para a identificação de lesões pré-malignas e malignas do colo uterino. Dados epidemiológicos demonstraram que a introdução da citologia no rastreio foi a medida de maior sucesso na redução da mortalidade por cancro do colo do útero (36).

Este exame consiste na visualização microscópica das células recolhidas do colo uterino. Após a colheita ser efectuada, as células recolhidas são estendidas numa lâmina e fixadas com um spray fixador. Esta forma de citologia (citologia convencional) tem vindo a ser progressivamente substituída pela citologia em meio líquido (Thinprep) (37). Na citologia em meio líquido, as células recolhidas são fixadas e só depois processadas e estendidas automaticamente, garantindo que ficam dispostas em monocamada, numa área de observação de 2 cm de

diâmetro. Este processamento, ao contrário do que acontece na citologia convencional, permite que uma grande parte da amostra seja representada na superfície da lâmina, o que reduz significativamente a taxa de esfregaços insatisfatórios. Da comparação entre as duas técnicas, verifica-se que a citologia em meio líquido aumenta a capacidade de detecção das lesões intra-epiteliais (38). Além da avaliação morfológica, a citologia em meio líquido permite ainda a realização de estudos complementares, como sejam os de biologia molecular.

1.2.2 Métodos moleculares

A forte associação entre a infecção HPV e cancro do colo do útero, levou ao desenvolvimento de sistemas de detecção moleculares, que passaram da área da investigação a auxiliares de diagnóstico em mulheres com citologias classificadas como células escamosas atípicas de significado indeterminado “ASC-US” e no seguimento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas. A combinação da citologia com o teste de HPV atinge um valor de eficácia muito alto e a sua utilização pode permitir aumentar os intervalos de triagem no rastreio do cancro do colo do útero (39). Apesar do seu potencial muito mais preciso e eficaz na detecção de lesões de alto grau, o teste molecular de HPV ainda não foi aprovado como principal método no rastreio primário. No entanto, uma análise conjunta dos estudos europeus recentes demonstrou que o risco de lesões pré-malignas em mulheres com teste de HPV negativo é, de facto, muito inferior ao conferido pela citologia negativa. Isto significa que, o teste molecular de HPV oferece mais garantias conferindo maior segurança entre os intervalos de rastreio. Em termos de risco acumulado para lesões de alto grau, a segurança proporcionada por um resultado molecular negativo no teste de HPV depois de 4 anos, é equivalente à de um resultado negativo na citologia após um ano (40).

O aparecimento de técnicas de genotipagem que permitem determinar os tipos de HPV permite esclarecer se a genotipagem de HPV pode melhorar de forma mais significativa e fiável a detecção de lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo do útero. Existem agora evidências de que os testes para HPV de alto risco são mais sensíveis e têm um maior valor preditivo negativo (VPN) para lesões de alto grau em comparação com a citologia cervico-vaginal (41,42,43). A

genotipagem do HPV poderá ser útil ao diferenciar o risco de desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e cancerosas em mulheres em que seja detectado o HPV 16 e 18, mesmo que estas tenham uma citologia negativa (44)

Captura Híbrida

A Captura Híbrida foi o primeiro teste molecular para detectar o DNA do HPV a ser aprovado pela “Food and Drugs Administration” (FDA) como auxiliar de diagnóstico. Este teste utiliza sondas de RNA específicas para detectar treze tipos de HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (sonda B) e cinco tipos de HPV de baixo risco: 6, 11, 42, 43 e 44 (sonda A). A Captura Híbrida não permite saber qual o tipo específico de HPV, mas apenas se o HPV está presente na amostra e, consoante a sonda usada, se é de alto ou de baixo risco (45).

Polymerase chain reaction (PCR)

É uma técnica molecular utilizada para amplificar regiões específicas do DNA de uma forma exponencial. Neste caso, o DNA do HPV vai ser amplificado através do uso de *primers* específicos complementares às regiões de interesse. Os protocolos mais frequentemente utilizados usam os *primers* de consenso GP5+/6+ e PGMY09/11, que amplificam parte do gene L1 do HPV (46, 47, 48, 49). A análise dos produtos amplificados pode ser feita de diversos modos, como gel de electroforese, hibridização em fitas de nitrocelulose e de sequenciação directa, entre outros (50).

PapilloCheck[®]

Este método de genotipagem identifica 24 tipos de HPV, sendo 18 tipos de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82 e 6 tipos de baixo de HPV de risco: 6, 11, 40, 42, 43 e 44. O método é baseado na amplificação por PCR de um fragmento com cerca de 350 bp do gene E1, com um conjunto de *primers* específicos e nucleótidos marcados com fluorescência (Cy5). A leitura é efectuada no CheckScanner com a excitação de comprimentos de onda de 532nm e 635 nm, o que permite a leitura da fluorescência (51).

Seeplex[®] HPV18 ASE Genotyping

O Seeplex[®] HPV 18 ASE pode detectar 13 tipos de HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 e 5 tipos de HPV de baixo risco: 6, 11, 42, 43 e 44. O método é baseado na amplificação por PCR multiplex do DNA alvo usando “Dual priming Oligonucleotide” DPO *primers* permitindo aumentar a sensibilidade e especificidade do PCR por impedir emparelhamentos inespecíficos durante o “annealing”. Não é descrita qual a região do HPV ampliada. A detecção é feita automaticamente após electroforese (52).

Digene[®] HPV Genotyping RH Test

Neste método são genotipados 18 tipos de HPV de alto risco: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. Este sistema de genotipagem utiliza os *primers* GP5+/6+ que amplificam um fragmento de 150pb do gene L1 do HPV. Após amplificação do produto com os *primers* biotinilados, o produto de PCR é desnaturado e hibridizado numa fita de nitrocelulose contendo sondas imobilizadas dos diferentes tipos de HPV (53).

CAPÍTULO II - OBJECTIVOS

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais frequente a nível mundial. Sabe-se que a infecção por HPV é causa necessária para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e de cancro do colo do útero. No entanto, apenas uma proporção das mulheres infectadas desenvolve cancro do colo do útero. Uma das razões subjacentes a esta observação está relacionada com a variabilidade dos tipos de HPV. A infecção por tipos de HPV de alto risco confere um risco de desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e de cancro do colo do útero superior àquele conferido pela infecção por tipos de HPV de baixo risco. Deste modo, na perspectiva da introdução do teste molecular de HPV como rastreio primário, bem como no seguimento clínico de mulheres com alterações citológicas, a detecção e caracterização do tipo de HPV assumem um papel de relevo.

Esta Tese tem como objectivo comparar, numa amostra de base hospitalar composta por citologias cérvico-vaginais positivas por Captura Híbrida, diferentes métodos de genotipagem de HPV. Mais especificamente pretende-se:

- Avaliar capacidade de detecção dos diferentes tipos de HPV dos métodos PapilloCheck[®], Seeplex[®] HPV18 ASE Genotyping e Digene[®] HPV Genotyping RH Test;
- Esclarecer se a capacidade de detecção dos diferentes métodos varia com a presença e tipo de anomalias citológicas das amostras.

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Este estudo teve como base as colheitas de citologia ginecológica em meio líquido (Thinprep) efectuadas na consulta de ginecologia e obstetrícia do Hospital de São João, Porto. Foram seleccionados consecutivamente para inclusão no estudo, 120 casos com resultado positivo para Captura Híbrida 2 (HC2) com sondas de alto risco. A amostra era constituída por mulheres de idades compreendidas entre os 16 e os 80 anos (média de $41,9 \pm 13,9$ anos e mediana de 40,0 anos). As 120 amostras foram sujeitas a genotipagem do HPV pelos métodos PapilloCheck[®], Seeplex[®] e Digene[®].

3.2 Métodos

3.2.1 Captura Híbrida (HC2)

O kit de HC2 foi usado de acordo com as instruções do fabricante (Digene[®] Corporation, USA Maryland, Gaithersburg). O HC2 utiliza um cocktail de sondas de RNA que permite a detecção de 13 tipos de HPV de alto risco. Os híbridos de RNA/DNA são capturados em fase sólida numa placa de captura que contém anticorpos que reconhecem os híbridos RNA/DNA. Estes são detectados com anticorpos conjugados com fosfatase alcalina que dão origem a um produto luminescente. A intensidade de luz emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra, fornecendo uma medida semi-quantitativa da carga viral. A leitura é calibrada para detectar aproximadamente 4.700 cópias do genoma (ou 1 pg / ml) de HPV (Figura 6).

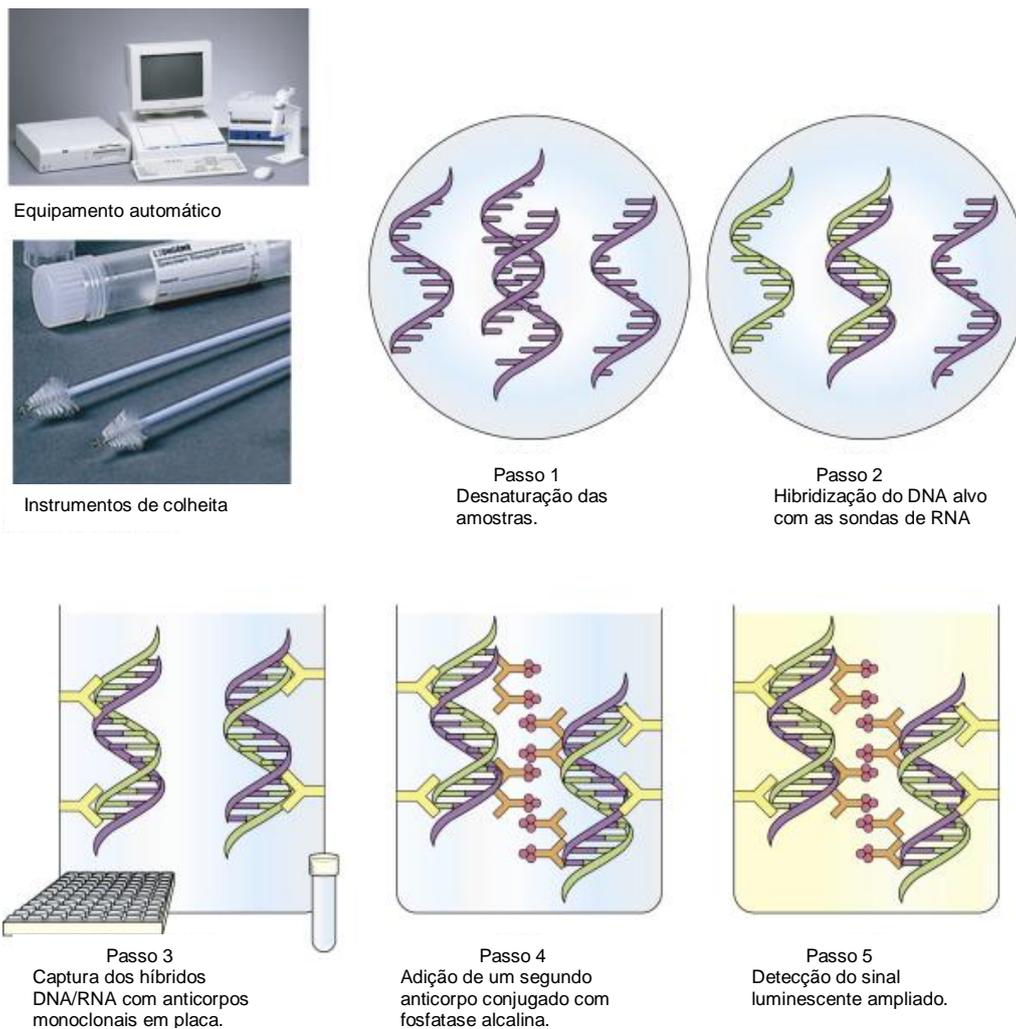


Figura 6
Esquema representativo da Captura Híbrida

Extracção e purificação de DNA

A extracção de DNA foi efectuada com o kit “NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). A extracção de DNA das amostras de citologia foi realizada adicionando a cada amostra tampão de lise e Proteinase K, seguida por período de incubação a 56°C durante 30 minutos. De seguida, para inactivar a proteinase K, efectuou-se uma incubação com tampão, adicionando-se de seguida o etanol para precipitar o DNA. Para a purificação do DNA foram efectuadas várias incubações em coluna. Por fim, procedeu-se à eluição do DNA por adição de tampão de eluição. As amostras foram armazenadas a -20°C até posterior utilização.

3.2.2 PapilloCheck®

O PapilloCheck® HPV genotyping assay foi usado de acordo com as instruções do fabricante (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha). O PapilloCheck® detecta 24 genótipos de HPV (18 de alto risco e 6 de baixo risco). Usando um PCR multiplex com *primers* específicos e nucleótidos marcados com fluorescência (Cy5) são amplificados fragmentos de 350 pb do gene E1 do HPV. Os híbridos são capturados em fase sólida em chip (low-density microarray plastic HTA12 chip). A detecção foi efectuada no CheckScanner com a excitação de comprimentos de onda de 532 e 635 nm (Figura 7).

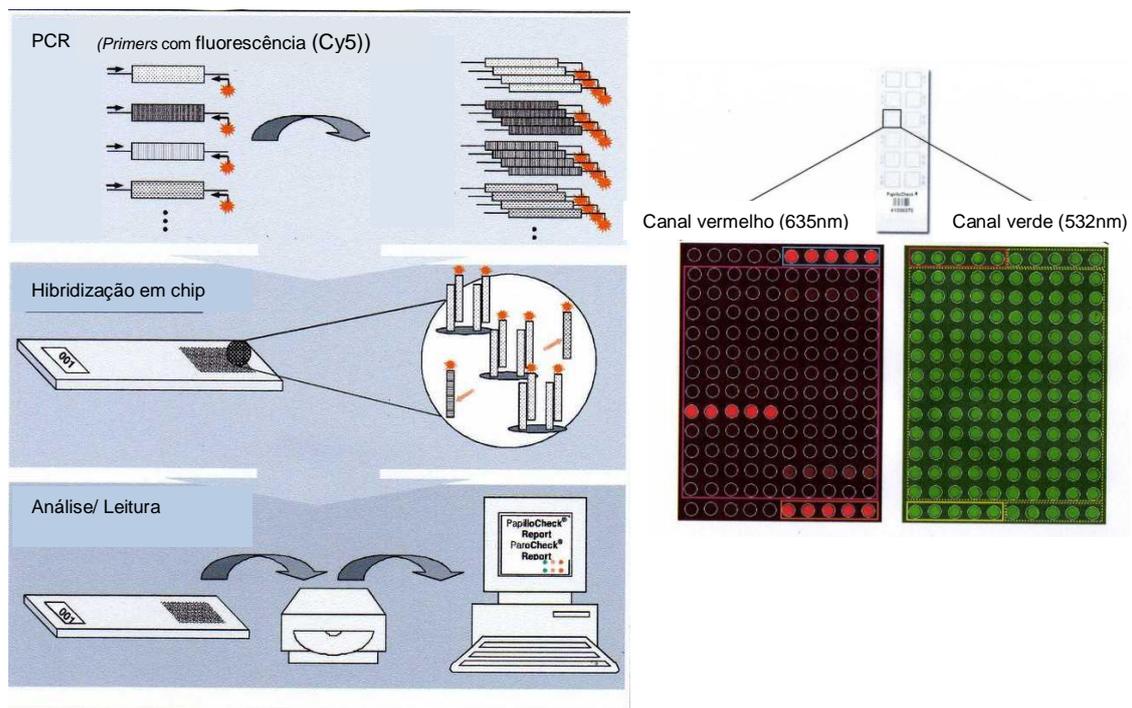


Figura 7
Esquema representativo do PapilloCheck®

3.2.3 Seeplex® HPV18 ASE Genotyping

O Seeplex® HPV18 ASE genotyping foi usado de acordo com as instruções do fabricante (Seegene, Seul, Coreia do Sul). Após a extração de DNA procedeu-se à amplificação por PCR com os *primers* DPO (Dual priming Oligonucleotide). Ao produto de PCR, foi adicionada solução de electroforese (Gene Scan™ 500 [LIZ/ROX®] Size Standard). A detecção foi efectuada através da avaliação dos

picos de cada produto amplificado correspondendo aos diferentes tipos de HPV (Figura 8).

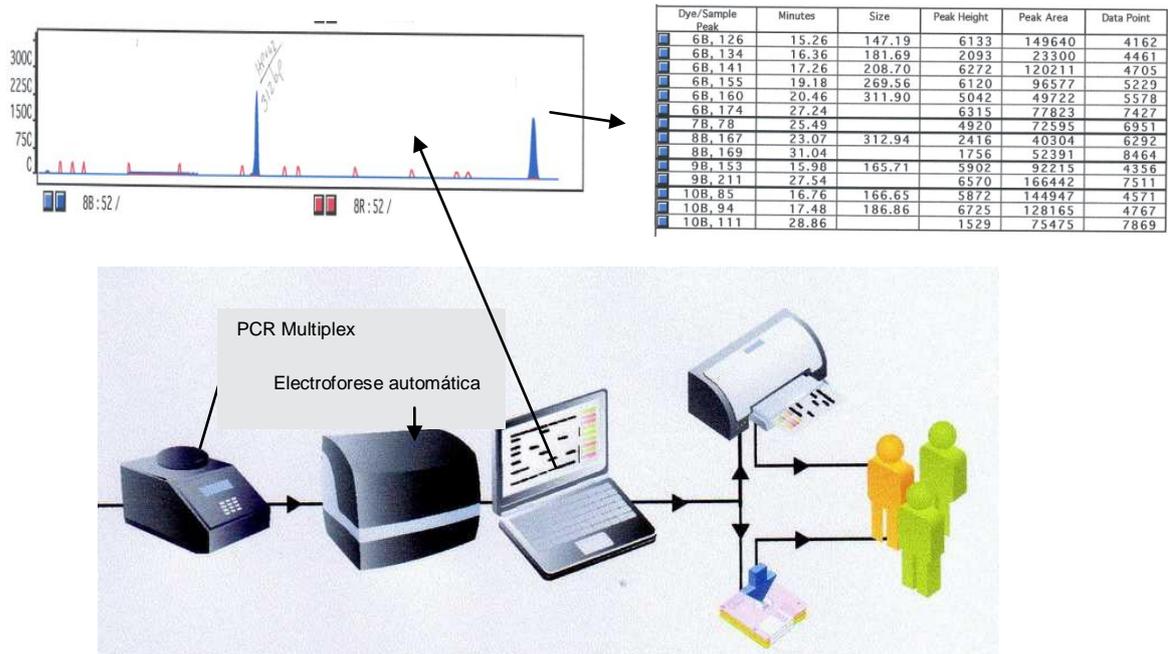


Figura 8
Esquema representativo do Seplex®

3.2.4 Digene® HPV Genotyping RH test

O Digene® HPV Genotyping RH test foi usado de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN Digene, USA, Maryland). Após amplificação do DNA alvo com os *primers* biotinilados, os produtos de PCR foram desnaturados e hibridizados em fitas de nitrocelulose, contendo sondas imobilizadas dos diferentes tipos de HPV. As reacções foram de seguida colocadas num Auto LIPA 48 (Innogenetics, Bélgica), onde se processa automaticamente a hibridização, lavagens e reacção cromagénicas. No final, os resultados aparecem como uma linha roxa sobre a tira de teste, permitindo a interpretação visual (Figura 9).

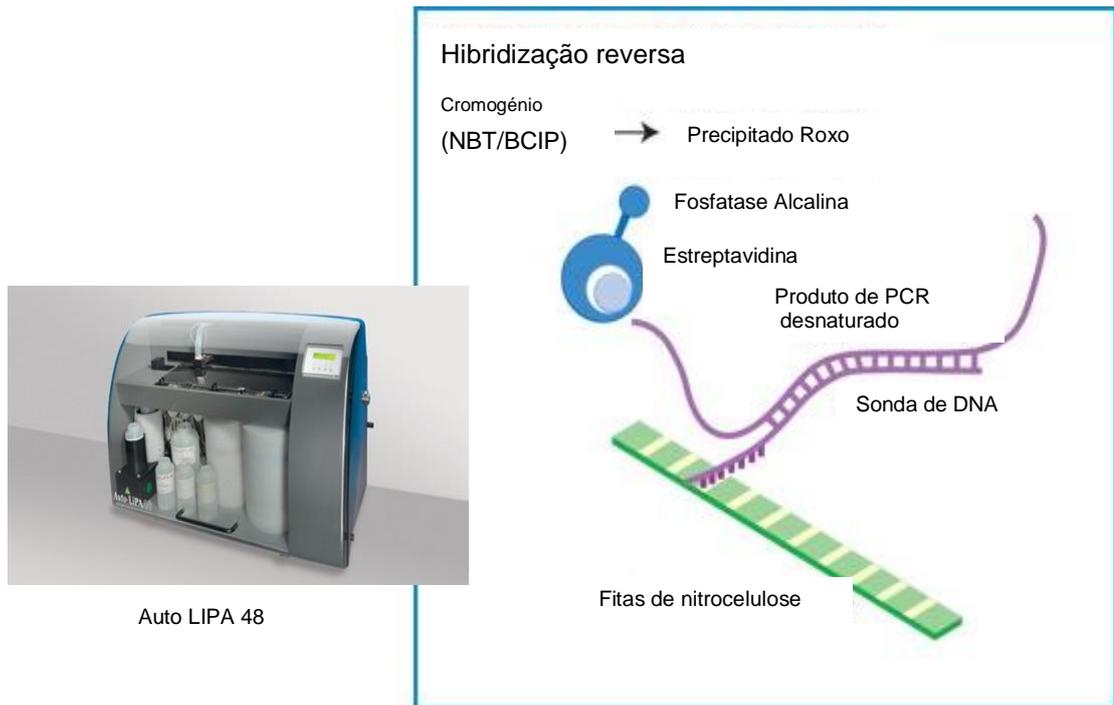


Figura 9
Esquema representativo do Digene® HPV Genotyping RH test

3.2.5 Análise estatística

A avaliação da concordância entre métodos de genotipagem foi feita através do teste kappa de Cohen. A magnitude dos valores de kappa tem o seguinte significado: <0 – não concordante; 0 a 0,20 – concordância baixa; 0,21 a 0,40 – concordância ligeira; 0,41 a 0,60 – concordância moderada; 0,61 a 0,80 – concordância substancial; 0,81 a 1 – concordância quase perfeita. Para a comparação das médias de idades entre os diferentes grupos lesionais, foi utilizado o teste t de Student não emparelhado. A relação entre o diagnóstico citológico e a presença de HPV foi avaliada pelos testes de chi-quadrado e Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados com o software Statview para Windows, versão 5.0 (SAS Institute Inc, EUA) e PASW statistic 18, versão 18.0.0 (SPSS Inc, EUA).

CAPÍTULO IV - RESULTADOS

4.1 Avaliação dos métodos de genotipagem

Todas as amostras avaliadas (n=120) foram positivas por Captura Híbrida com sondas de alto risco. A taxa de detecção de HPV dos diferentes métodos de genotipagem variou entre 73,3% para o PapilloCheck[®], 76,7% para o Seeplex[®] e 79,2% para o Digene[®] (Tabela 1).

Tabela 1

Taxa de detecção de DNA de HPV pelos diferentes métodos de genotipagem nas 120 amostras

HPV	PapilloCheck [®] N(%)	Seeplex [®] N(%)	Digene [®] N(%)
Negativo	32 (26,7%)	28 (23,3%)	25 (20,8%)
Positivo	88 (73,3%)	92 (76,7%)	95 (79,2%)

Todas as percentagens foram calculadas com N=120 como denominador.

Do total das amostras estudadas, 70 (58,3%) foram positivas para HPV pelos três métodos. Da mesma forma, 7 (5,8%) dos casos foram negativos pelos três métodos, correspondentes possivelmente a casos falsos positivos pela Captura Híbrida.

Tabela 2

Detecção de infecções simples e múltiplas por HPV pelos diferentes métodos de genotipagem

Infecção	PapilloCheck [®] N=88 (%)	Seeplex [®] N=92 (%)	Digene [®] N=95 (%)
Simple	44 (50,0%)	38 (41,3%)	56 (58,9%)
Múltipla	44 (50,0%)	54 (58,7%)	39 (41,1%)
2 genótipos	24 (27,3%)	27 (29,3%)	31 (32,6%)
3 genótipos	11 (12,5%)	15 (16,3%)	5 (5,3%)
≥ 4 genótipos	9 (10,2%)	12 (13,0%)	3 (3,2%)

A taxa de detecção de infecções múltiplas variou entre 41,1% no caso do Digene[®], 50% no PapilloCheck[®] e 58,7% no Seeplex[®] (Tabela 2). De uma forma geral, o Seeplex[®] detectou mais tipos de HPV nas amostras individuais do que os outros métodos, sendo que 16,3% do total de casos apresentavam infecção por 3 tipos de HPV e 13% estavam infectados por quatro ou mais tipos de HPV. Ainda

assim, a taxa de detecção de amostras com dois tipos de HPV foi superior no Digene® (32,6%).

No PapilloCheck® e no Digene®, o tipo de HPV mais frequentemente detectado foi o HPV 16, com taxas de detecção de 15,8% e de 45,0%, respectivamente (Tabela 3). Já com o método Seeplex®, o tipo de HPV mais prevalente foi o HPV 51, com uma taxa de detecção de 28,3%. Os tipos víricos com as frequências seguintes mais elevadas detectadas pelo PapilloCheck®, foram o HPV 56 (11,7%) e o HPV 53 (10,0%), pelo Seeplex® foram o HPV 16 (26,7%) e o HPV 31 (15,8%) e pelo Digene® foram o HPV 31, o HPV 56 (10,8% ambos) e o HPV 45 (9,2%).

De seguida, compararam-se as taxas de detecção e as concordâncias entre os resultados individuais de cada método de genotipagem e o genótipo HPV consenso para os 13 tipos de HPV detectados em comum pelos três métodos de genotipagem (Tabela 4). O genótipo consenso foi criado com base na concordância de resultados de, pelo menos, dois testes de genotipagem. Assim, o resultado de um tipo de HPV de um teste individual foi considerado como verdadeiro positivo ou verdadeiro negativo, quando pelo menos dois testes de genotipagem deram resultado concordante para um tipo particular de HPV. Em 10 casos, o HPV consenso foi considerado negativo. As restantes 110 amostras consideradas como HPV positivo serviram de base para o cálculo dos valores de kappa dos 13 genótipos de HPV comuns aos três métodos.

Esta comparação revelou baixas sensibilidades de detecção do PapilloCheck® para os HPV 58 (0%), HPV 35 (66,7%) e HPV 16 (72%) e uma concordância absoluta para 8 de tipos HPV (HPV 18, 39, 45, 51, 52, 56, 59 e 68). Utilizando o Seeplex® verificou-se uma ausência de detecção do HPV 45 (0%), baixa sensibilidade de detecção do HPV 18 (33,2%) e concordâncias absolutas em 10 tipos de HPV (HPV 16, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58 e 68). O Digene® permitiu detectar seis tipos de HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 45 e 56) com uma sensibilidade de 100% e foi o único método que não apresentou ausência de concordância (0%) para nenhum dos genótipos. Isto apesar de a sensibilidade de detecção dos HPV 68 (16,7%), HPV 59 (50,0%), HPV 35 e HPV 51 (66,7%) ter sido relativamente baixa.

Os valores de kappa obtidos por comparação dos resultados obtidos com o Seeplex[®] e o HPV consenso foram, de uma forma geral, mais baixos variando entre -0,028 e 1. Já com o Digene[®], os valores de kappa oscilaram entre 0,247 e 1 e com o PapilloCheck[®] os valores de kappa foram os melhores, variando entre 0,774 e 1 (Tabela 4).

Tabela 3

Prevalência dos genótipos de HPV determinada pelos diferentes métodos

Genótipo	Classificação	PapilloCheck [®]		Seeplex [®]		Digene [®]	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
16	Alto risco	19	(15,8%)	32	(26,7%)	54	(45,0%)
18	Alto risco	4	(3,3%)	1	(0,8%)	5	(4,2%)
31	Alto risco	10	(8,3%)	19	(15,8%)	13	(10,8%)
33	Alto risco	8	(6,7%)	14	(11,7%)	8	(6,7%)
35	Alto risco	2	(1,7%)	4	(3,3%)	2	(1,7%)
39	Alto risco	8	(6,7%)	7	(5,8%)	6	(5,0%)
45	Alto risco	8	(6,7%)	2	(1,7%)	11	(9,2%)
51	Alto risco	9	(7,5%)	34	(28,3%)	6	(5,0%)
52	Alto risco	7	(5,8%)	12	(10,0%)	5	(4,2%)
56	Alto risco	14	(11,7%)	11	(9,2%)	13	(10,8%)
58	Alto risco	4	(3,3%)	5	(4,2%)	4	(3,3%)
59	Alto risco	6	(5,0%)	8	(6,7%)	4	(3,3%)
68	Alto risco	6	(5,0%)	13	(10,8%)	1	(0,8%)
53	Alto risco	12	(10,0%)	NA		2	(1,7%)
66	Alto risco	5	(4,2%)	NA		6	(5,0%)
73	Alto risco	4	(3,3%)	NA		0	(0,0%)
82	Alto risco	6	(5,0%)	NA		5	(4,2%)
26	Alto risco	NA		NA		0	(0,0%)
70	Alto risco	4	(3,3%)	NA		NA	
6	Baixo risco	4	(3,3%)	4	(3,3%)	NA	
11	Baixo risco	0	(0,0%)	0	(0,0%)	NA	
42	Baixo risco	15	(12,5%)	20	(16,7%)	NA	
43	Baixo risco	2	(1,7%)	3	(2,5%)	NA	
44/55*	Baixo risco	5*	(4,2%)	3	(2,5%)	NA	
40	Baixo risco	2	(1,7%)	NA		NA	

NA: não aplicável; Todas as percentagens foram calculadas com N=120 como denominador; * o PapilloCheck[®] não permite distinguir entre ao HPV 44 e 55 e, desta forma, amostras com sinal nesta sonda podem conter um ou ambos os tipos de HPV.

Tabela 4

Comparação entre os parâmetros dos genótipos individuais de HPV detectados em cada teste e o genótipo consenso.

Tipo	Consenso			PapilloCheck®			Seeplex®				Digene®			
	N total	+	+ +/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	
16	110	25	19	18	72,0%	0,774 (0,698 - 0,85)	32	25	100%	0,835 (0,776 - 0,894)	54	25	100%	0,467 (0,395 - 0,539)
18	110	3	4	3	100%	0,853 (0,708 - 0,998)	1	1	33,3%	0,493 (0,187 - 0,799)	5	3	100%	0,741 (0,566 - 0,916)
31	110	12	10	10	83,3%	0,899 (0,829 - 0,969)	19	12	100%	0,739 (0,647 - 0,831)	13	12	100%	0,955 (0,91 - 1)
33	110	8	8	7	87,5%	0,865 (0,771 - 0,959)	14	8	100%	0,699 (0,585 - 0,813)	8	8	100%	1 (1 - 1)
35	110	3	2	2	66,7%	0,796 (0,597 - 0,995)	4	3	100%	0,853 (0,708 - 0,998)	2	2	66,7%	0,796 (0,597 - 0,995)
39	110	7	8	7	100%	0,928 (0,218 - 1,638)	7	7	100%	1 (1 - 1)	6	6	85,7%	0,918 (0,837 - 0,999)
45	110	6	8	6	100%	0,848 (0,742 - 0,954)	2	0	0%	-0,028 (-0,043 - -0,013)	11	6	100%	0,684 (0,553 - 0,815)
51	110	9	9	9	100%	1 (1 - 1)	34	9	100%	0,332 (0,245 - 0,419)	6	6	66,7%	0,786 (0,667 - 0,905)
52	110	7	7	7	100%	1 (1 - 1)	12	7	100%	0,714 (0,594 - 0,834)	5	5	71,4%	0,824 (0,703 - 0,945)
56	110	11	14	11	100%	0,907 (0,842 - 0,972)	11	11	100%	1 (1 - 1)	13	11	100%	0,907 (0,842 - 0,972)
58	110	4	4	0	0%	1 (1 - 1)	5	4	100%	0,884 (0,77 - 0,998)	4	3	75,0%	0,741 (0,565 - 0,917)
59	110	6	6	6	100%	1 (1 - 1)	8	5	83,3%	0,695 (0,551 - 0,839)	4	3	50,0%	0,582 (0,393 - 0,771)
68	110	6	6	6	100%	1 (1 - 1)	13	6	100%	0,602 (0,468 - 0,736)	1	1	16,7%	0,274 (0,056 - 0,492)

A percentagem dos valores positivos foi calculada com N=110 como denominador; +/+ : resultado idêntico no método individual e no consenso; IC: intervalo de confiança.

4.2 Relação entre métodos de genotipagem e alterações citológicas

Dos 120 casos em estudo, 57,5% não tinham anomalias citológicas (negativos para lesão intraepitelial ou malignidade) e 42,5% apresentavam anomalias das células epiteliais (Tabela 5). Das mulheres com anomalias citológicas, a maioria apresentava LSIL (47,0%), sendo a segunda lesão mais frequente a ASC-US (33,3%). As lesões de alto grau HSIL foram observadas em 11,8% dos casos, tendo apenas sido observado um caso de carcinoma epidermóide (2%). Nesta amostra, em 3 casos (5,9%) a citologia detectou células glandulares atípicas (AGC-NOS). As mulheres com anomalias citológicas eram significativamente mais novas (37,6 anos) do que aquelas que não apresentavam anomalias (45,2 anos; $p=0,003$). Dentro do grupo das mulheres com alterações citológicas, as que apresentam HSIL eram mais velhas (39,5 anos) do que aquelas que apresentavam LSIL (36,4 anos) ou ASC-US (36,4 anos). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas

Tabela 5
Classificação citológica das amostras

	N (%)	Idade média \pm desvio padrão
Sem anomalias citológicas	69 (57,5%)	45,2 \pm 13,9
Com anomalias citológicas	51 (42,5%)	37,6 \pm 12,9
ASC-US	17 (33,3%)	36,4 \pm 14,8
LSIL	24 (47,0%)	36,4 \pm 8,9
HSIL	6 (11,8%)	39,5 \pm 10,1
AGC-NOS	3 (5,9%)	36,3 \pm 18,2
Carcinoma epidermóide	1(2,0%)	80

Todas as percentagens foram calculadas com N=120 como denominador.

Para a análise da capacidade de detecção de anomalias citológicas de cada um dos métodos, foram comparadas as taxas de detecção de HPV nos casos sem e com anomalias citológicas (Tabela 6). Para todos os métodos a prevalência da infecção por HPV foi significativamente superior nos casos com anomalias citológicas, tendo a taxa de detecção variado entre 88,2% com o método Seeplex[®], 92,2% com o Digene[®] e 94,1% com o PapilloCheck[®]. Dentro dos casos

com anomalias citológicas, quer o PapilloCheck[®], quer o Digene[®], foram capazes de detectar 100% das lesões de alto grau/carcinoma epidermóide.

Tabela 6

Relação entre o diagnóstico citológico e a presença de HPV

	PapilloCheck [®] ¹		Seeplex [®] ¹		Digene [®] ¹	
	-	+ (%)	-	+ (%)	-	+ (%)
Sem anomalias citológicas	29	40 (58,0%)	22	47 (68,1%)	21	48 (69,6%)
Com anomalias citológicas	3	48 (94,1%)	6	45 (88,2%)	4	47 (92,2%)
ASC-US/AGC- NOS	3	17 (85,0%)	5	15 (75,0%)	2	18 (90,0%)
LSIL	0	24 (100%)	0	24 (100%)	2	22 (91,7%)
HSIL/Carcinoma epidermóide	0	7 (100%)	1	6 (85,7%)	0	7 (100%)

¹ $p \leq 0,01$ na comparação entre os casos sem e com anomalias citológicas (Teste de Fisher); -: número de casos negativos; +: número de casos positivos.

Realizou-se uma análise semelhante para verificar se a presença de infecção por mais do que um tipo de HPV estava relacionada com a presença de alterações citológicas. Os resultados apresentados na Tabela 7 permitiram concluir que, a presença de genótipos múltiplos é mais frequente nos casos com anomalias citológicas (64,6%, 73,3% e 46,8%, para o PapilloCheck[®], Seeplex[®] e Digene[®] (respectivamente) do que nos casos sem anomalias citológicas (32,5%, 44,7% e 35,4%, respectivamente). Esta associação foi estatisticamente significativa para os métodos PapilloCheck[®] e Seeplex[®] apesar de com o Digene[®] se ter observado a mesma tendência. No entanto, a prevalência de infecções múltiplas não parece estar relacionada, nesta amostra, com o grau das lesões citológicas.

Tabela 7

Relação entre o diagnóstico citológico e a presença de infecções simples e múltiplas por HPV

	PapilloCheck®¹		Seeplex®¹		Digene®	
	simples	múltiplo (%)	simples	múltiplo (%)	simples	múltiplo (%)
Sem anomalias citológicas	27	13 (32,5%)	26	21 (44,7%)	31	17 (35,4%)
Com anomalias citológicas	17	31 (64,6%)	12	33 (73,3%)	25	22 (46,8%)
ASC-US/AGC-NOS	8	9 (52,9%)	5	10 (66,7%)	10	8 (44,4%)
LSIL	5	19 (79,2%)	5	19 (79,2%)	9	13 (59,1%)
HSIL/Carcinoma epidermóide	4	3 (75,0%)	2	4 (66,7%)	6	1 (14,3%)

¹ $p \leq 0,005$ na comparação entre os casos sem e com anomalias citológicas (Teste de Fisher).

De seguida, avaliou-se a detecção pelos diferentes métodos dos HPV16 HPV 31 variavam com a presença e tipo de anomalias citológicas. Relativamente ao HPV16, os métodos de Seeplex® e Digene® apresentaram taxas de detecção de 100%, independentemente de presença ou tipo de lesão citológica (Tabela 8). Pelo contrário, o PapilloCheck® tem taxas de detecção de apenas 50% nas amostras sem alterações citológicas e nas amostras com ASC-US. De forma semelhante, para o HPV 31 também é o PapilloCheck® que apresenta taxas de detecção distintas entre o grupo de citologias sem anomalias (60%) e com anomalias (100%). Já o Seeplex® e o Digene® não variaram relativamente a capacidade de detectar o HPV 31 nos diferentes tipos de citologias (Tabela 9).

Tabela 8

Comparação entre os parâmetros do genótipo HPV 16 detectado em cada teste e o HPV 16 consenso

Consenso	PapilloCheck®					Seeplex®				Digene®			
	+	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)
Sem anomalias citológicas	10	6	5	50,0%	0,572 (0,726 - 0,418)	13	10	100%	0,840 (0,929 - 0,751)	33	10	100%	0,285 (0,367 - 0,203)
Com anomalias citológicas	15	13	13	86,7%	0,900 (0,969 - 0,831)	19	15	100%	0,821 (0,905 - 0,737)	21	15	100%	0,741 (0,837 - 0,645)
ASC-US/AGC-NOS	4	2	2	50,0%	0,609 (0,849 - 0,369)	6	4	100%	0,727 (0,902 - 0,552)	8	4	100%	0,526 (0,710 - 0,342)
LSIL	8	8	8	100%	1	10	8	100%	0,824 (0,913 - 0,735)	9	8	100%	0,909 (0,998 - 0,820)
HSIL/Carcinoma epidermóide	3	3	3	100%	1	3	3	100%	1	4	3	100%	0,720 (0,969 - 0,471)

+/+: resultado idêntico no método individual e no consenso; IC: intervalo de confiança.

Tabela 9

Comparação entre os parâmetros do genótipo HPV 31 detectado em cada teste e o HPV 31 consenso

Consenso	PapilloCheck®					Seeplex®				Digene®			
	+	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)	+	+/+	Detecção	Kappa (IC 95%)
Sem anomalias citológicas	5	31	3	60,0%	0,734 (0,913 - 0,555)	9	5	100%	0,681 (0,827 - 0,535)	6	5	100%	0,900 (0,999 - 0,801)
Com anomalias citológicas	7	7	7	100%	1	10	7	100%	0,788 (0,909 - 0,672)	7	7	100%	1
ASC-US/AGC-NOS	3	3	3	100%	1	3	3	100%	1	3	3	100%	1
LSIL	4	4	4	100%	1	7	4	100%	0,654 (0,829 - 0,479)	4	4	100%	1
HSIL/Carcinoma epidermóide	0	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA	0	0	NA	NA

+/+: resultado idêntico no método individual e no consenso; IC: intervalo de confiança; NA: estes valores não podem ser calculados pelo facto de, nos casos com HSIL, não se ter detectado HPV 31.

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A infecção persistente por HPV de alto risco é causa necessária para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e de cancro do colo do útero. Na perspectiva da introdução do teste molecular de HPV no rastreio primário, no seguimento clínico de mulheres com alterações citológicas, bem como na era pós-vacinação, a detecção e caracterização do tipo de HPV assumem um papel relevante.

O objectivo principal deste estudo foi o de comparar os resultados obtidos através da utilização de três métodos de genotipagem de HPV. Com esse fim, foi usada uma amostra de base hospitalar, cujas citologias tinham sido previamente sujeitas a Captura Híbrida com um cocktail de sondas para detecção de HPV de alto risco. Das amostras cujo resultado foi positivo para captura híbrida, foram então seleccionadas consecutivamente 120. O material citológico foi submetido a extracção de DNA e, de seguida, foram caracterizados os tipos de HPV presentes através de três métodos distintos de genotipagem, nomeadamente o PapilloCheck[®], o Seeplex[®] e o Digene[®].

Na primeira análise dos resultados obtidos, verificou-se heterogeneidade entre os três métodos na detecção da infecção por HPV. Só cerca de 58% das amostras foram positivas para a presença de HPV pelos três métodos em simultâneo. Estes resultados podem ser explicados por diferenças de sensibilidade, definida pelo tamanho dos fragmentos que são amplificados na reacção de PCR de cada método. A menor capacidade do PapilloCheck[®] detectar a presença de HPV pode estar relacionada com o facto de o tamanho do fragmento amplificado ser de 350 pb, tamanho superior por exemplo ao fragmento amplificado pelo método Digene[®] (150 pb). Este aspecto poderá também estar relacionado com a carga viral presente na amostra, já que estudos anteriores mostraram que, em amostras com cargas virais mais elevadas existe maior concordância entre diferentes testes na capacidade de detecção do HPV (54).

De forma semelhante, pode ser explicada a heterogeneidade de resultados relativos à detecção de génotipos múltiplos, em que o teste mais sensível foi o Seeplex[®] (58,7%). O Seeplex[®] foi ainda aquele que permitiu observar mais tipos

diferentes de HPV na mesma amostra (4 ou mais genótipos de HPV em 13% dos casos).

Há ainda que referir que, em cerca de 6% dos casos, os três métodos deram simultaneamente um resultado negativo para HPV. Isto sugere que estes casos são falsos positivos na Captura Híbrida, já que os tipos de HPV cobertos pelas sondas de alto risco do cocktail utilizado na captura híbrida, são comuns aos três métodos de genotipagem utilizados neste estudo.

Relativamente à capacidade de detecção de tipos específicos de HPV, também foram observadas claras diferenças entre os métodos. Estas diferenças podem estar directamente dependentes do formato dos primers em cada método e do tipo de detecção realizada após a amplificação do DNA-alvo (54). Por exemplo, a maior capacidade de detecção do HPV 16 pelo Digene[®], pode dever-se ao facto de, após o PCR, as amostras sofrerem um processo de hibridização com sondas específicas para cada tipo vírico. Tal não acontece por exemplo com o Seeplex[®], já que apenas há electroforese do produto amplificado e determinação do tamanho do fragmento.

A fim de aprofundar a análise do desempenho de cada método de genotipagem, foram tidas em consideração algumas diferenças entre os métodos, como sejam os tipos de que são detectados por cada um deles. O PapilloCheck[®] detecta 18 tipos de HPV de alto risco e, dos métodos estudados, é o único que detecta o HPV 70. O Seeplex[®] detecta 13 e o Digene[®] detecta 18 tipos de HPV de alto risco, sendo que este é o único método que detecta o HPV 26. O Seeplex[®], ao contrário dos outros dois métodos, não detecta os tipos 53, 66, 73 e 82. O PapilloCheck[®] e o Seeplex[®] detectam ainda os HPV de baixo risco 6, 11, 40 (apenas o PapilloCheck[®]), 42, 43 e 44.

Com base nos genótipos comuns detectados por todos os métodos, foram definidos genótipos consenso. Estes foram criados com base na concordância de resultados de, pelo menos, dois testes de genotipagem. A definição de genótipos consenso, permitiu a definição de taxas de detecção, bem como a determinação da concordância entre testes (valores de kappa) para os treze genótipos comuns, todos de alto risco, detectados pelos três métodos. Esta análise revelou que o PapilloCheck[®] apresenta deficiências na detecção do HPV 16 (72%), enquanto

que o Seeplex[®] e o Digene[®] têm sensibilidades de detecção de 100%. Já na detecção do HPV 18, o método com pior performance é o Seeplex[®], com uma taxa de detecção de apenas 33%, por comparação com os outros dois métodos, com taxas de detecção de 100%. Também no Seeplex[®], a taxa de detecção do HPV 45 é de 0%, enquanto nos dois outros métodos é de 100%. Estas deficiências estão reflectidas nos respectivos valores de kappa. Há no entanto que ter algumas precauções na interpretação dos valores de kappa, já que o genótipo consenso se baseia na concordância do resultado de testes com sensibilidades analíticas diferentes, o que pode causar um viés nas análises.

De novo, o formato dos primers de cada método e o tipo de detecção após o PCR podem ajudar a explicar estas discrepâncias. No Seeplex[®], o tamanho dos fragmentos correspondentes às infecções por HPV 18 e 45 são de 463 pb e 380 pb, respectivamente. Por oposição, os HPV cujos produtos amplificados são menores, como por exemplo, os HPV 33 (150 pb), HPV 51 (167 pb), HPV 16 (184 pb) e HPV 52 (206 bp), são melhor detectados pelo método taxas de detecção de 100%.

Para investigar o valor clínico dos diferentes testes de genotipagem, a taxa de detecção da presença de HPV foi comparada dentro de cada grupo lesional. Esta comparação mostrou que o PapilloCheck[®] e o Digene[®] têm uma taxa de detecção para as lesões de alto grau de 100% e que o Seeplex[®] tem apenas 85,7%. De qualquer forma, todos os métodos revelaram uma boa taxa de detecção em relação às citologias com diagnósticos de “lesão”.

A presença de genótipos múltiplos de HPV na amostra em estudo, com dois dos métodos, foi mais prevalente em casos com alterações citológicas. A co-infecção com tipos múltiplos de HPV tem vindo a ser reportada na literatura como relativamente comum, principalmente nos anos mais recentes e acompanhando os avanços técnicos nos métodos de detecção do HPV (55).

Relativamente à capacidade que cada método tem de detectar os diferentes genótipos de HPV nos diferentes grupos lesionais, optou-se por fazer a análise dos dois genótipos mais prevalentes na amostra. Assim, para o HPV 16 e para o HPV 31, verificou-se que, ao contrário dos outros dois métodos de genotipagem, o PapilloCheck[®] não detecta 50% e 60% dessas infecções nas citologias normais.

O PapilloCheck[®] falha ainda na detecção de 50% dos casos infectados com HPV 16 nos casos com ASC-US. Assim, se este teste molecular fosse utilizado no rastreio primário, as mulheres incluídas nestes grupos não iriam possivelmente ter o seguimento adequado, pois o método daria taxas elevadas de falsos negativos para o HPV 16 e o HPV 31.

Tendo em conta que a causa de mais de 80% dos carcinomas (epidermóides e adenocarcinomas) invasivos do colo do útero pode ser atribuída ao conjunto dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45 (56) o único método com 100% de sensibilidade para detectar infecções por estes tipos víricos foi o Digene[®].

Dado o facto de a amostra incluída neste estudo ter sido seleccionada pela positividade para HPV de alto risco pela captura híbrida, não foi realizado um estudo de associação entre os diferentes genótipos de HPV e os diversos quadros lesionais.

Na situação actual e num futuro próximo, com gerações sucessivas de mulheres a serem vacinadas para o HPV, espera-se uma redução na prevalência de anomalias citológicas. Num curto prazo, e em locais onde exista rastreio de cancro do colo do útero, é de prever a redução de citologia com anomalias, bem como o número de mulheres encaminhadas para a colposcopia (57). Estimativas sugerem uma redução nas lesões de baixo grau em 40% nas mulheres vacinadas contra os HPV 16 e 18, e 50% nas vacinadas para os HPV 6, 11, 16 e 18 (58). Quando as mulheres vacinadas atingirem a idade de rastreio, as anomalias citológicas serão muito baixas, o que poderá levar a um aumento de erros humanos devido à monotonia da leitura dos esfregaços negativos. Por conseguinte, resultados com mais falsos negativos levarão à diminuição da sensibilidade (já bastante baixa) da citologia em relação ao teste de HPV. Neste cenário, uma estratégia mais sensata para o rastreio de cancro de colo do útero seria a de usar o teste de HPV como primeira linha e tirar partido da especificidade conhecida da citologia cérvico-vaginal como uma segunda linha de triagem de mulheres com teste de HPV positivo (59).

Globalmente, os resultados obtidos reforçam a necessidade de que os métodos de genotipagem do HPV sejam robustos, fiáveis e com sensibilidade e especificidade elevadas de modo a poderem vir a ser utilizados quer como primeira linha no rastreio primário, bem como no seguimento clínico de mulheres com alterações citológicas.

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*, 36: 794.
2. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*, 3: 1151-1157.
3. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80: 38-3815.
4. World Health Organization. 2002. Cervical cancer screening in developing countries: report of a WHO consultation. Geneva, 1-75.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
6. http://www.ipoportomin-saude.pt/Downloads_HSA/IPOP/RO_Nacional_2001.pdf
7. Bosch FX, de Sanjosé S. 2003 Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 31: 3-13.
8. Lau S, Franco EL. 2005. Management of low-grade cervical lesions in young women. *CMAJ*, 173: 771-774.
9. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, et al. 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*, 97:1072-1079.

10. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, et al. 2006. Variations in the age specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *J Natl Cancer Inst*, 119: 2677-2684.
11. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7: 453-459.
12. Marluce Bibbo and David Wilbur. 2008. *Comprehensive Cytopathology. Cytologic screening Programs*, chapter 3.
13. Collier B, Goobar-Larsson L, Sokolowsky M, Schwartz S, 1998. Translational Inhibition in Vitro of Human Papillomavirus Type 16 L2 mRNA Mediated through Interaction with Heterogenous Ribonucleoprotein K and Poly (rC)-binding Proteins 1 and 2. *J Biol Chem*, 273: 22648-22656.
14. Finnen RL, Erickson K D, Chen XS, Garcea, RL. 2003. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol*, 77: 1410-4826.
15. Terhune, SS, Hubert, WG, Thomas JT, Laimins, LA, 2001. Early Polyadenylation Signals of Human Papillomavirus Type 31 Negatively Regulate Capsid Gene Expression. *J Virol*, 75: 8147-8157.
16. Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324: 17-27.
17. Zur H, 1986. In *Viruses and Cancer*, (eds Rigby PMJ & Wikie NM). Cambridge Univ. Press, Cambridge 83-90.
18. Doorbar J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110: 525-541.
19. Ciaran BJ, Woodman Stuart I, Collins and Lawrence S. Young. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7: 11-22.

20. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 69: 2989-2997.
21. Jeon S, Lambert PF. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1654-1658.
22. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. 2001. Transcriptional activation of the telomerase h TERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol*, 75: 4467-4472.
23. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248: 76-79.
24. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*, 8: 4099-4105.
25. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*, 14: 3065-3073.
26. Richart RM. 1973. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu*, 8:301-308.
27. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N. 2001. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. *JAMA*, 287: 2114-2119.
28. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*, 338: 423-428.
29. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, et al. 2008 Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*, 68: 307-313.

30. Clifford G. et al. Chapter 3. 2006. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 24 Suppl 3: 26-34.
31. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1995. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 64: 1-378.
32. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. 2002. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 359: 1093-1101.
33. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. 1997. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*, 89: 868-877.
34. La Ruche G, You B, Mensah-Ado I, Bergeron C, Montcho C, Ramon R, Touré-Coulibaly K, Welffens-Ekra C, Dabis F, Orth G. 1998. Human papillomavirus and human immunodeficiency virus infections: relation with cervical dysplasia-neoplasia in African women. *Int J Cancer*, 76: 480-486.
35. Papanicolaou GM, Traut H. 1997. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Arch Pathol Lab Med*, 121: 211-224.
36. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahe C, et al. 2005. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med*, 353: 2158-2168.
37. Parkin DM, Miller AB, Chamberlain J, Day NE, Hakama M, Proroc PC. 1991. Screening for cervix cancer in developing countries. editors. *Cancer screening*. Cambridge: Cambridge University Press, 184-98.
38. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. 2008. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta analysis. *Obstet Gynecol*, 111: 167-177.
39. Franco EL. Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. 2003. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 31: 89-96.

40. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. 2008. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*, 13: 337-1754.
41. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, et al. 2003. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*, 95:46-52.
42. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, et al. 2003. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet*, 362:1871-1876.
43. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. 2006. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 119:1095-10101.
44. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. 2006. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol*, 103:12-17.
45. Iftner T, Villa LL. 2003. Human papillomavirus technologies. 2003. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 31: 80-8.
46. Bernard H, Chan S, Manos MM, Ong C, Villa LL, Delius H, et al. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogeny algorithms. *J Infect Dis*, 170: 1077-1085.
47. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, 76: 1057-1062.
48. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*, 36: 3020-3027.

49. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 38: 357-361.
50. Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H, et al. 2002. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol*, 68: 417-423.
51. <http://www.greinerbioone.com/en/germany/content/edi/>
52. http://www.seegene.co.kr/en/diagnosis/seegene_diagnostics.php
53. <http://www.hpvinformation.com/Getting-the-Test.html>
54. Betti Schopp, Barbara Holz, Manola Zago, Frank Stubenrauch, Karl-Ulrich Petry, Susanne Krüger Kjaer, Thomas Iftner. 2010. Evaluation of the performance of the novel PapilloCheck[®] HPV genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. *J med virol*, 82: 605-615.
55. Mejlhede N, Pedersen BV, Frisch M, Fomsgaard A. 2010. Multiple human papilloma virus types in cervical infections: competition or synergy? *APMIS*, 118:346-52.
56. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. 2010. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer*, In press, DOI 10.1002/ijc.25396.
57. Huh W. 2008. The Quadrivalent HPV Vaccine Phase IIb/III Investigators. Impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 virus-like particle vaccine on the incidence of abnormal Pap test and cervical procedures. *Gynecol Oncol*, 108: S10.
58. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 14: 1157-1164.

59. Warner Huh, Mark H, Einstein b, Thomas J, Herzog c, Eduardo L. Franco. 2010. What is the role of HPV typing in the United States now and in the next five years in a vaccinated population?,117: 481–485.

