

KARINA SERRAVALLE¹
JOSÉ EDUARDO LEVI²
CRISTINA OLIVEIRA²
CONCEIÇÃO QUEIROZ¹
ÁDILA DANTAS¹
EDUARDO STUDART¹

Comparison of two techniques for HPV genotyping in women with high-grade squamous intraepithelial lesion

Comparação entre duas técnicas de genotipagem do HPV em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau

Artigo Original

Palavras-chave

Colo do útero/virologia
Neoplasia intraepitelial cervical/virologia
Infecções por papillomavirus/virologia
Genótipo
Papillomaviridae/isolamento & purificação
Papillomaviridae/genética

Keywords

Cervix uteri/virology
Cervical intraepithelial neoplasia/virology
Papillomavirus infections/virology
Genotype
Papillomaviridae/isolation & purification
Papillomaviridae/genetics

Resumo

OBJETIVO: Comparar o desempenho de duas técnicas de genotipagem de papilomavírus humano (HPV), Linear Array e PapilloCheck, em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau (LIAG). **MÉTODOS:** Foram selecionadas 88 mulheres com diagnóstico citopatológico de LIAG em 2 centros de referência em patologia cervical em Salvador, Bahia, no período de julho de 2006 a janeiro de 2009. Após o diagnóstico citopatológico de LIAG, foram realizadas a coleta de células do colo uterino para a genotipagem do HPV e a biópsia sob visão colposcópica para análise histopatológica do fragmento retirado. Posteriormente à confirmação de NIC2+ pelo exame histopatológico, foi realizada a genotipagem do HPV em 41 mulheres pelas técnicas Linear Array e PapilloCheck. **RESULTADOS:** Os dois testes apresentaram taxa de concordância geral para detecção do vírus HPV de 97,2% (35/36). Das 36 amostras válidas, 35 (97,2%) foram consideradas positivas em ambos os testes e apenas uma amostra (2,8%) foi considerada discordante. Os genótipos do HPV mais prevalentes detectados através da técnica do Linear Array foram: HPV 16, HPV 56, HPV 35, HPV 45 e HPV 70; e pela técnica PapilloCheck foram: HPV 16, HPV 56, HPV 11, HPV 35 e HPV 42. Foi observado índice semelhante de infecção por múltiplos tipos do HPV nos dois testes analisados (72,5% no Linear Array e 75,0% no PapilloCheck). **CONCLUSÕES:** Os testes de genotipagem Linear Array e PapilloCheck apresentaram um desempenho equivalente na detecção dos tipos de HPV oncogênicos em mulheres com LIAG, tendo o PapilloCheck a vantagem de ser um método que evita a subjetividade da leitura dos genótipos de HPV.

Abstract

PURPOSE: The aim of this study was to compare the performance of two human papillomavirus (HPV) genotyping techniques, Linear Array and PapilloCheck, in women with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). **METHODS:** A total of 88 women with cytological diagnosis of HSIL were recruited at 2 reference centers in cervical pathology in Salvador, Bahia, Brazil, from July 2006 to January 2009. After the cytological diagnosis of HSIL, cervix cells were collected to determine the HPV genotype and a biopsy was obtained under colposcopic vision for histopathological analysis. After the confirmation of CIN2+ by histopathology, HPV genotyping was performed on 41 women by the Linear Array and PapilloCheck methods. **RESULTS:** Both tests showed an overall concordance rate for HPV detection of 97.2% (35/36). Of the 36 valid samples, 35 (97.2%) were positive in both tests and 1 (2.8%) was discordant, with the Linear Array indicating the presence of multiple types. The most prevalent HPV genotypes detected by the Linear Array technique were HPV 16, HPV 56, HPV 35, HPV 45, and HPV 70; and those detected by the PapilloCheck technique were HPV 16, HPV 56, HPV 11, HPV 35, and HPV 42. A similar rate of infection with multiple HPV types was observed with the two tests (72.5% with the Linear Array and 75.0% with the PapilloCheck). **CONCLUSIONS:** Linear Array genotyping assay and PapilloCheck showed equivalent performance for the detection of oncogenic HPV types in women with HSIL, with PapilloCheck having the advantage of being a method that avoids subjectivity when reading the HPV genotypes.

Correspondência

Karina Serravalle
Laboratório de Anatomia Patológica e Biologia Molecular Studart & Studart
Avenida Princesa Leopoldina, 431 – Barra
CEP: 40150-080
Salvador (BA), Brasil

Recebido

06/11/2014

Aceito com modificações

06/01/2015

DOI: 10.1590/S0100-720320150005206

Laboratório de Anatomia Patológica e Biologia Molecular Studart & Studart – Salvador (BA); Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

¹Laboratório de Anatomia Patológica e Biologia Molecular Studart & Studart – Salvador (BA), Brasil.

²Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

O câncer cervical ou do colo do útero é responsável por cerca de 500 mil novos casos de câncer no mundo anualmente e aproximadamente 231 mil mulheres morrem anualmente por este tipo de neoplasia¹. Para o ano de 2014, no Brasil, são esperados 15.590 casos novos de câncer do colo do útero, com uma incidência estimada de 15,3 casos para 100 mil mulheres e para o estado da Bahia são esperados 1.120 casos novos². No Brasil, registra-se uma prevalência da infecção por papilomavírus humanos (HPVs) oncogênicos semelhante à de outros países, variando entre 9 e 27% na população de rastreamento^{3,4}.

A relação entre câncer cervical e HPV do grupo oncogênico está bem estabelecida. Com o uso de técnicas de biologia molecular se consegue detectar o DNA do HPV em 99,7% dos espécimes de câncer cervical invasivo^{5,6}. A detecção do DNA do HPV pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é fundamental para determinar o genótipo de HPV presente em amostras clínicas provenientes das mucosas genitais a fim de verificar se os HPVs são de alto ou baixo risco para o desenvolvimento das neoplasias cervicais. Além disso, a determinação do genótipo do HPV auxilia também na escolha da conduta mais apropriada para pacientes infectadas por esse vírus e é importante em estudos epidemiológicos e de história natural⁷. Existem diversas técnicas para detecção dos genótipos de HPV, cada uma com sua sensibilidade e especificidade características. O Linear Array é um ensaio manual com interpretação subjetiva, o PapilloCheck é parcialmente manual com a vantagem de automação na última fase do processo, quando o chip é varrido por um scanner a laser, evitando interpretação subjetiva.

O desenvolvimento do câncer cervical está ligado a infecções persistentes por HPVs oncogênicos e geralmente é precedido por um período de latência. Entretanto, apenas uma minoria de mulheres infectadas por HPVs oncogênicos irá desenvolver o câncer⁸. A lesão intra-epitelial de alto grau (LIAG) é precursora do câncer cervical e ocorre quando o HPV, replicando em células imaturas, impede a maturação do epitélio e sua diferenciação, induzindo uma replicação contínua de células imaturas e acúmulo de anormalidades genéticas que poderão levar à formação de um clone de células cancerosas⁹.

A taxa de associação entre mulheres com diagnóstico de LIAG e infecção por HPV é bastante alta, especialmente em relação ao HPV16¹⁰. No estado da Bahia, só há um trabalho descrevendo especificamente os genótipos em mulheres com esse tipo de lesão¹¹. No presente estudo foram selecionadas as técnicas de genotipagem Linear Array e PapilloCheck, pois são testes altamente sensíveis e bem aceitos na literatura para a identificação dos principais genótipos oncogênicos que podem acarretar o desenvolvimento de LIAG. O presente

trabalho tem como objetivo comparar o desempenho de duas técnicas de genotipagem para HPV em mulheres com LIAG em Salvador, Bahia.

Métodos

Trata-se de um estudo transversal feito com mulheres provenientes do Instituto de Diagnóstico e Exames Médicos (IDEM) e do Centro Estadual de Oncologia (CICAN), centros de referência em patologia cervical na cidade de Salvador, Bahia, recrutadas no período de julho de 2006 a janeiro de 2009. Foram selecionadas 88 mulheres com diagnóstico citopatológico de LIAG.

Cerca de 15 dias após o diagnóstico citopatológico de LIAG, as pacientes retornaram ao ambulatório, aonde preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participar do estudo. Em seguida, foram realizadas a coleta de células do colo uterino para genotipagem do HPV e a biópsia sob visão colposcópica da área da zona de transformação atípica (ZTA) para análise histopatológica do fragmento retirado.

Das 88 mulheres selecionadas com diagnóstico citopatológico de LIAG, 41 (46,6%) tiveram o diagnóstico confirmado de NIC2+ com o exame histopatológico e foram encaminhadas para realização da genotipagem com o uso das técnicas Linear Array (Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA) e PapilloCheck (Greinerbio-one®, Monroe, NC).

As amostras foram coletadas com escova e transferidas para um tubo contendo 1 ml do meio *Universal Collection Medium* (UCM) (Qiagen, Biotecnologia do Brasil LTDA.). O material coletado foi mantido sob refrigeração de 2 a 8°C e transportado para o laboratório de Ginecologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (Com-HUPES) em até 14 dias após a coleta. A extração do DNA-HPV foi realizada através da técnica fenol-clorofórmio.

Genotipagem das amostras utilizando Linear Array HPV

O teste de genotipagem Linear Array HPV (Genotyping Test, Roche Molecular Diagnostics, Alameda, CA) é um teste qualitativo *in vitro* capaz de detectar simultaneamente 37 tipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73(MM9), 81, 82(MM4), 83(MM7), 84(MM8), IS39 e CP6108.

As amostras foram amplificadas utilizando o conjunto de *primers* genéricos para HPV denominados PGMY09/11 biotinilados¹², que amplificam um fragmento de 450 pares de bases (pb), correspondente à região L1 do HPV, e os *primers* GH20 e PC04, também biotinilados, que amplificam um fragmento de 268 pb do gene da β -globina humana, utilizado como controle de qualidade da amostra e dos processos de extração, amplificação e hibridização, seguindo as especificações do fabricante.

A identificação dos diferentes genótipos do HPV foi feita mediante leitura visual das linhas azuis que apareceram nas tiras, as quais foram comparadas com o padrão das linhas de referência fornecidas pelo fabricante.

Genotipagem das amostras utilizando o PapilloCheck

O ensaio PapilloCheck (Greinerbio-one®, Monroe, NC) permite a detecção e genotipagem simultânea de 24 tipos de HPV. Entre eles, 18 genótipos são classificados como de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 66, 56, 58, 59, 68, 70, 73 e 82), enquanto 6 são de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44/55). Esse teste utiliza um PCR multiplex com *primers* fluorescentes que amplificam um fragmento de 350 pb do gene E1 do HPV, compreendendo 28 sondas, cada uma em 5 replicatas fixadas em um *chip* de DNA. A co-amplificação do gene humano ADAT1 é utilizada como controle interno da reação. A hibridização é realizada em um *chip* de *microarray*, que é automaticamente escaneado e analisado utilizando o CheckScanner™ (GreinerBio-One) e o *software* CheckReport™ (GreinerBio-One), respectivamente. Os resultados gerados foram considerados como positivos ou negativos para cada genótipo contemplado no teste.

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0, que também foi utilizado como ferramenta para a comparação dos resultados da genotipagem entre as duas técnicas. Os dados foram apresentados por meio de gráficos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Com-HUPES (001/2007). Foram respeitadas a Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial e a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde Brasileiro.

Resultados

Genotipagem pela técnica Linear Array HPV

Das 41 amostras analisadas, o HPV foi detectado em 38 amostras (92,7%), apenas 1 amostra (2,4%) foi considerada inválida devido à ausência da amplificação do gene da β -globina humana e em 2 (4,9%) o HPV não foi detectado. Das 38 amostras positivas para HPV, 76,3% (29/38) apresentaram infecção múltipla e somente 23,7% (9/38) apresentaram infecção por um único tipo de HPV. O HPV 16 foi o mais prevalente, sendo encontrado em 86,8% das amostras; nas infecções múltiplas, o HPV 16 esteve presente em 93,1% (27/29) das amostras e nas infecções únicas em 66,7% (6/9). Os outros 4 genótipos mais prevalentes foram o HPV 56 (26,5%), HPV 35 (26,5%), HPV 45 (18,4%) e o HPV 70 (18,4%). O HPV 18 esteve presente apenas em três amostras (7,9%). Dentre as mulheres com infecção única, 6 apresentaram infecção pelo HPV 16 (66,7%), 2 pelo HPV 18 (22,2%) e 1 pelo HPV 35 (11,1%). A composição dos cinco genótipos

mais frequentes de HPV detectados pela técnica Linear Array está exposta na Figura 1.

Genotipagem pela técnica PapilloCheck

Das 41 amostras analisadas, o HPV foi detectado em 35 (85,4%). Cinco amostras (12,2%) foram consideradas inválidas devido à ausência da amplificação do gene ADAT1 e 1 (2,4%) foi negativa para HPV. Destas 35 mulheres positivas para HPV por esse método, 77,1% (27/35) apresentaram infecção múltipla e somente 22,9% (8/35) apresentaram um único tipo de HPV. O HPV 16 foi o mais frequente, sendo encontrado em 80,0% (28/35) das amostras; nas infecções múltiplas o HPV 16 esteve presente em 81,5% (22/27) das amostras e nas infecções únicas, em 75,0% (6/8).

Os outros 4 genótipos mais prevalentes foram o HPV 56 (22,8%), HPV 11 (22,8%), HPV 35 (20,0%) e o HPV 42 (20,0%). O HPV 18 esteve presente em apenas em 3 amostras (8,6%). Nas mulheres com infecção única, 6 foram causadas pelo HPV 16 (75,0%), 1 pelo HPV 18 (12,5%) e 1 pelo HPV 35 (12,5%). A composição dos cinco genótipos mais frequentes do HPV detectados pelo PapilloCheck está exposta na Figura 2.

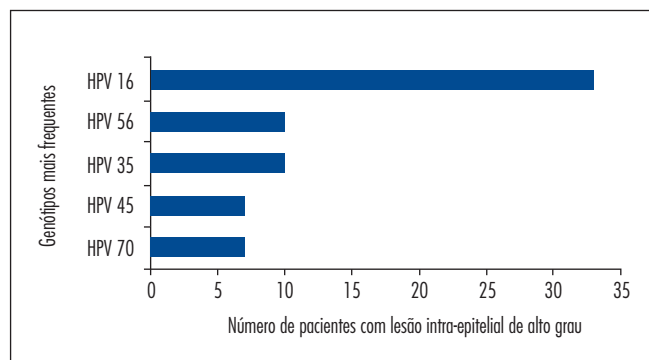


Figura 1. Frequência dos cinco genótipos mais frequentes do papilomavírus humano detectados pela técnica Linear Array em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau

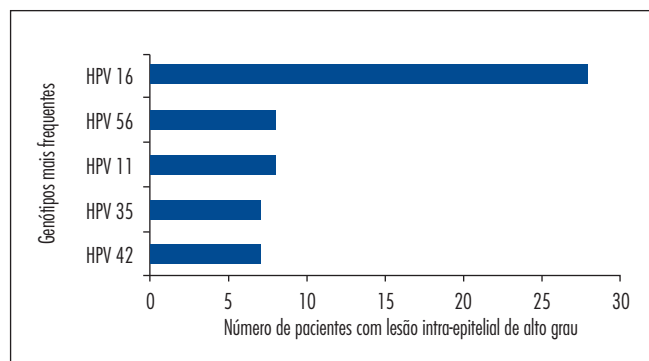


Figura 2. Frequência dos cinco genótipos mais frequentes do papilomavírus humano detectados pela técnica PapilloCheck em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau

Comparação entre as duas técnicas de genotipagem do HPV: Linear Array e PapilloCheck

Dentre as 36 amostras válidas, 35 (97,2%) foram consideradas positivas em ambos os testes e apenas 1 amostra (2,8%) foi considerada discordante: positiva no Linear Array e negativa no PapilloCheck. Os testes apresentaram uma concordância de 97,2% (35/36) para a detecção do HPV. Houve cinco amostras inválidas: dessas, uma foi inválida para as duas técnicas, duas amostras foram positivas no Linear Array e inválidas no PapilloCheck e duas amostras foram negativas no Linear Array e inválidas no PapilloCheck.

Os dois testes apresentaram uma taxa de detecção de 83,4% (35/41) para HPV's oncogênicos, tanto em infecções múltiplas quanto em infecções por um único tipo de HPV. A relação entre número de genótipos de HPV's oncogênicos em infecções únicas e múltiplas está demonstrada na Figura 3.

O teste de genotipagem Linear Array apresentou 22,5% (9/40) de infecção por um único genótipo de HPV; 72,5% (29/40) com 2 ou mais genótipos e em apenas 5,0% das amostras (2/40) o HPV não foi detectado. No teste PapilloCheck, os achados foram condizentes com o Linear Array, apresentando um índice para infecção única de 22,2% (8/36) de infecção por 2 ou mais genótipos de 75,0% (27/36) e apenas em 1 amostra (2,8%) não foi possível a identificação do genótipo do HPV por esse teste (Figura 3). Em suma, foi observado um índice semelhante de infecção por múltiplos tipos do HPV nos dois testes analisados: Linear Array com 72,5% (29/40)

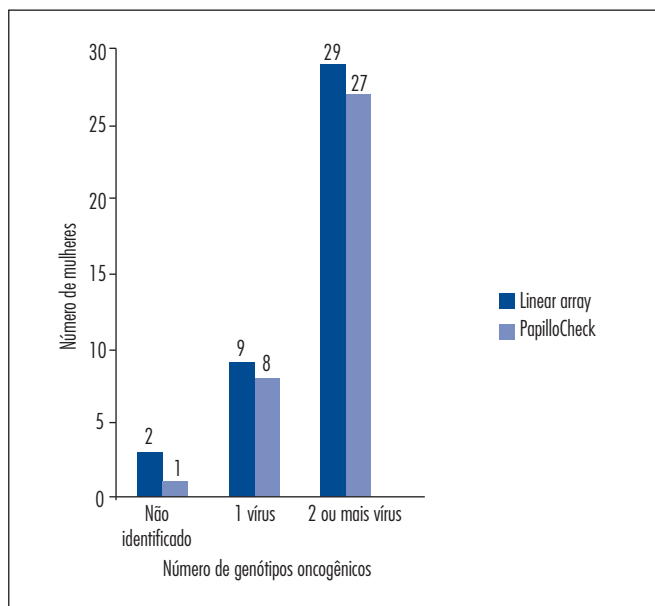


Figura 3. Relação entre número de genótipos de papilomavírus humano oncogênicos e técnicas utilizadas no diagnóstico molecular do vírus em mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau

e PapilloCheck com 75,0% (27/36). Uma tabela com os resultados da anatomia patológica e das técnicas Linear Array e PapilloCheck estão disponíveis mediante solicitação aos autores.

Discussão

Este é o primeiro estudo a comparar o desempenho de duas técnicas de genotipagem em mulheres com LIAG em nossa região. Os dois testes apresentaram taxa de detecção equivalente para os genótipos oncogênicos do HPV tanto em infecções múltiplas quanto únicas. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por outros autores¹³⁻¹⁵.

Os genótipos mais prevalentes detectados com uso da técnica do Linear Array neste estudo foram: HPV 16, HPV 56, HPV 35, HPV 45 e HPV 70, e os genótipos mais prevalentes detectados pela técnica PapilloCheck foram: HPV 16, HPV 56, HPV 11, HPV 35 e HPV 42. Diversos autores demonstram que os tipos mais comuns de HPV's oncogênicos que infectam o colo uterino são: HPV 16, HPV 18, HPV 45, HPV 31, 33 e HPV 35¹⁶⁻²⁰. No presente estudo, quatro desses genótipos foram detectados em mulheres com LIAG. De acordo com estudos realizados em todo o mundo, inclusive no Brasil, o HPV 16 é o genótipo mais frequentemente encontrado, embora haja uma variação importante em relação à frequência de infecção por outros tipos²¹.

Neste estudo, dentre as 41 amostras de mulheres com LIAG, o HPV 16 foi detectado em 86,8% pelo teste de genotipagem Linear Array e em 80,0% pelo PapilloCheck. Em um estudo realizado por Halfon et al.²², comparando as duas técnicas foi encontrada uma frequência do HPV 16 de 45% pelo PapilloCheck e de 47% pelo Linear Array, taxas um pouco abaixo das encontradas no presente estudo. Neste estudo, a distribuição do HPV 16 em infecções múltiplas e únicas estão de acordo com vários relatos na literatura que mostram uma alta prevalência do HPV 16 em pacientes com LIAG^{23,24}. No Brasil, esses dados foram demonstrados por vários autores em recente estudo de revisão que relatou a prevalência do HPV 16 em 67,0% das mulheres com LIAG²¹. Em um estudo recente feito no estado da Bahia foi demonstrado que o HPV 16 foi o tipo mais frequente nas mulheres com LIAG, estando presente em 42,4%¹¹.

No presente estudo foi encontrada alta taxa de infecção por múltiplos genótipos do HPV em mulheres com LIAG em ambos os testes. Não há evidência de interação entre os genótipos de HPV e o risco de câncer, portanto, pode-se supor que cada infecção é independentemente associada a um risco de pré-câncer e câncer¹⁰. No entanto, há relatos controversos de estudos de coorte, alguns sugerindo que os genótipos de HPV atuam sinergicamente e outros que

não demonstram essa ação sinérgica entre os genótipos de HPV¹⁰. Em um estudo transversal com cerca de 770 mulheres com LIAG não foram observados efeitos aditivos entre os tipos de HPV e o risco de LIAG em mulheres com infecção múltipla¹⁰.

O HPV 56 foi o segundo genótipo mais detectado neste estudo. Levi et al.⁴ e Bruno et al.¹¹ relataram esse genótipo como o segundo mais frequente no estado de São Paulo e na Bahia, respectivamente. Barra et al.²⁵ encontraram o HPV 56 como o quinto mais prevalente em mulheres com LIAG em Brasília, Distrito Federal. Mais trabalhos com o uso de testes moleculares permitirão definir a eventual efetividade da inclusão do HPV 56 em futuras vacinas.

No presente estudo, o HPV 18 foi detectado em apenas três amostras em ambos os testes (representando 7,9% no Linear Array e 8,6% no PapilloCheck). Um estudo feito por Halfon et al.²² demonstrou que a frequência do HPV 18 foi de 7% pelo Linear Array e de 6% pelo PapilloCheck em mulheres com LIAG. De acordo com estudos feitos no Brasil, o HPV 18 foi detectado em apenas 3,3 e 5,4% das amostras analisadas, respectivamente^{1,11}. Esses achados, incluindo o do presente estudo, mostram que o HPV 18 não é muito frequente no Brasil, corroborando dados da literatura^{1,11,22}.

Neste estudo, os genótipos HPV 31, HPV 33 e HPV 45 foram encontrados em 10,5; 2,6 e 18,4% pelo Linear Array e em 8,5; 5,7 e 2,9% pelo PapilloCheck, respectivamente. Halfon et al.²², comparando essas duas técnicas, encontraram uma frequência para os genótipos do HPV 31, HPV 33 e HPV 45 no teste de genotipagem pelo Linear Array de 14; 7 e 2%; e pelo PapilloCheck de 13; 4 e 3%, respectivamente. Esses achados foram similares aos encontrados no presente estudo.

Dentre as amostras consideradas válidas neste estudo, houve apenas uma amostra discordante entre o Linear Array e o PapilloCheck. Essa última técnica não conseguiu detectar o HPV em uma amostra com LIAG. O PapilloCheck é um ensaio baseado na detecção de um fragmento de 350 pares de bases do gene E1 do HPV. O Linear Array utiliza *primers* PGMY09/11 biotinilados para amplificar o fragmento de 450 pares de bases correspondente à região L1 do genoma do HPV. Dessa forma, esses dois testes de genotipagem utilizam *primers* e regiões do genoma do HPV diferentes e, portanto, pequenas discrepâncias são aceitáveis. Em relação às cinco amostras inválidas pelo PapilloCheck e uma pelo Linear Array, não houve amplificação do gene ADAT1 e nem da β -globina nos dois testes, respectivamente.

Uma limitação deste estudo foi o pequeno número de amostras analisadas em mulheres com LIAG. Entretanto, este estudo foi pioneiro na região e demonstrou que os testes de genotipagem Linear Array e PapilloCheck apresentaram um desempenho equivalente na detecção dos tipos de HPV oncogênicos em mulheres com LIAG, tendo o PapilloCheck a vantagem de automação na última fase do processo, evitando interpretações subjetivas.

As técnicas de genotipagem são importantes para o prognóstico das lesões epiteliais no colo uterino e são cruciais para avaliar os fatores associados à regressão, progressão e persistência da infecção por HPV cervical e identificar os grupos de alto risco e a susceptibilidade de infecção para o desenvolvimento da prevenção e estratégias de controle²¹. Além disso, a identificação dos tipos de HPV que são mais comumente associados ao câncer cervical em diferentes regiões pode sugerir uma necessidade de cobertura de um determinado tipo de HPV que não está presente nas vacinas e também nos testes de rastreio por DNA-HPV²⁶.

Referências

- Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC. Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(6):617.e1-7.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância [Internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [citado 2014 Ago 10]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>
- Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LOZ, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(1):123-30.
- Levi JE, Longatto-Filho A, Eluf-Neto J, Rodrigues CL, Oliveira CM, Carloni AC, et al. Evaluation of HPV molecular tests in primary screening for cervical cancer in Brazil. *Open J Obstet Gynecol*. 2014;4(8):470-8.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-9.
- Oliveira CM, Fregnani JH, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer*. 2013;13:357.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 12):2959-68.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-50.

9. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl 1):S16-24.
10. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM, et al. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis.* 2014;209(6):855-64.
11. Bruno A, Serravalle K, Travassos AG, Lima BG. [Genotype distribution of human papillomavirus in women from the state of Bahia, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(9):416-22. Portuguese.
12. Graviitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coulée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
13. Hesselink AT, Bulkman NW, Berkhof J, Lorincz AT, Meijer CJ, Snijders PJ. Cross-sectional comparison of an automated hybrid capture 2 assay and the consensus GP5+/6+ PCR method in a population-based cervical screening program. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3680-5.
14. Monsonogo J, Bohbot JM, Pollini G, Krawec C, Vincent C, Merignargues I, et al. Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol.* 2005;99(1):160-8.
15. Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods.* 2009;156(1-2):77-83.
16. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cancer Cervical (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796-802.
17. Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Br J Cancer.* 1994;69(1):114-9.
18. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, de Lucena Batista R, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer.* 2000;10(2):143-50.
19. Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macêdo R, Bisi F, et al. [Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(3):235-40. Portuguese.
20. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):181-4.
21. Ayres AR, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saúde Pública.* 2010;44(5):963-74.
22. Halfon P, Benmoura D, Khiri H, Penaranda G, Blanc B, Riggio D, et al. Comparison of the clinical performance of carcinogenic HPV typing of the Linear Array and Papillocheck HPV-screening assay. *J Clin Virol.* 2010;47(1):38-42.
23. International Agency for Research on Cancer. Handbooks of cancer prevention: cervix cancer screening. Lyon: IARC; 2005.
24. Nakagawa JTT, Schirmer J, Barbieri M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. *Rev Bras Enferm.* 2010;63(2):307-11.
25. Barra GB, Caixeta MS, Costa PG, Velasco LF, Abdalla LF, Costa SS. HPV infection pattern and genotype distribution in normal, low-grade, and high-grade cervical lesions. *Clin Chem.* 2012;58(10 Suppl):A227.
26. Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(5):297-301.