

Rastreamento do câncer cervical pela associação da citologia em meio líquido com a PCR em tempo real para Papillomavirus humano de alto risco em mulheres atendidas em um laboratório de análises clínicas na cidade de Belém, Pará, Brasil.

Renan Chaves de Lima^{a,*}, Luiz Carlos Santana da Silva^b

^a Amaral Costa Medicina Diagnóstica, Setor de Biologia Molecular, Belém, PA, Brasil

^b Universidade federal do Pará, Faculdade de Biomedicina, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, Belém, PA, Brasil

Resumo

O objetivo do estudo é determinar a prevalência de infecções por HPV, realizar a associação da citologia em meio líquido (CML) com a análise molecular de DNA do HPV de alto risco (HR-HPV) e verificar o comportamento viral em mulheres que procuraram os serviços diagnósticos da instituição por mais de uma vez, bem como fornecer informações relevantes à classe médica referentes ao rastreio primário do câncer cervical. O estudo foi do tipo observacional, descritivo e de caráter retrospectivo. Para o rastreio, realizou-se a CML e a detecção e genotipagem do HR-HPV por PCR em tempo real pelo sistema *cobas® HPV Test*. Considerando-se um total de 987 amostras, observou-se uma prevalência de 38,50% de mulheres na faixa etária entre 31 a 40 anos, 25,03% com detecção do HR-HPV, 5,47% com presença de alterações morfológicas celulares e 4,25% apresentaram uma combinação de HR-HPV detectável com CML alterada. A detecção do DNA para HR-HPV mostrou-se significativamente associada com a presença de alterações morfológicas celulares ($\chi^2 = 81,78$; $p < 0,0001$) e o risco relativo demonstrou que de cada 7 mulheres com HR-HPV detectável, uma poderá apresentar alterações morfológicas celulares. Da prevalência global de HR-HPV (14 tipos), as frequências de HPV-16, HPV-18, 12 outros genótipos de HR-HPV e coinfeção foram de 11,34% (28/247), 1,21% (3/247), 73,28% (181/247) e 14,17% (35/247), respectivamente. A prevalência de HR-HPV diminuiu com o aumento da idade. O teste de biologia molecular utilizado mostra-se como uma ferramenta útil no diagnóstico e monitoramento das infecções por HPV. Este é eficaz como estratégia diagnóstica de prevenção para o desenvolvimento de lesões precursoras e do câncer cervical. A

* Correspondência do autor para: Rua Antonio Barreto, 325, Umarizal - Belém/Pará, Brasil.
Endereço de e-mail: biologia.molecular@amaralcosta.com.br (Renan de Lima).

recomendação de um novo algoritmo como opção de rastreamento primário utiliza a alta sensibilidade e estratificação de risco da biologia molecular, juntamente com a alta especificidade da citologia para um equilíbrio ideal no rastreamento do câncer cervical.

Palavras-chave: Papillomavirus humano, Câncer cervical, Biologia molecular

Introdução

As infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) são uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST's) mais comuns. A maioria das mulheres e homens sexualmente ativos será infectada em algum momento de suas vidas. A infecção persistente pelo HPV é a principal causa de câncer do colo do útero (conhecido também como câncer cervical) em mulheres - 99% dos casos. Os tipos HPV-16 e HPV-18 são responsáveis por 70% dos cânceres cervicais e lesões cervicais precursoras¹.

O câncer cervical é uma das principais causas de mortalidade entre as mulheres. É o quarto tipo mais frequente de câncer e a terceira causa de morte por câncer entre as mulheres nos países em desenvolvimento. Em 2012, a estimativa era de 527.600 casos novos de câncer cervical, com uma taxa de 265.700 mortes no mundo².

A última informação para mortalidade no Brasil aponta que ocorreram, em 2013, 5.430 mortes por câncer cervical em mulheres. Em todo o país, segundo estimativas do Ministério da Saúde, para o ano de 2016, no Brasil, eram esperados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é o primeiro mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição. Do total, 820 acometeriam mulheres no estado do Pará e 31,71% desses seriam registrados na capital Belém, com um risco estimado de 33 casos para cada 100 mil mulheres³.

Aproximadamente 200 tipos de HPV foram identificados por sequenciamento de DNA⁴. O HPV é atualmente considerado como o principal

fator etiológico da Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) e do câncer cervical propriamente dito⁵. Existem aproximadamente 40 diferentes tipos de HPV que podem infectar a mucosa anogenital de humanos⁶. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem frequentemente associados às lesões precursoras e as neoplasias invasivas, são representados principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82⁷. Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta do DNA dos HPV dos tipos 16 e 18 em câncer cervical, os HPV foram bem caracterizados como agentes causadores do câncer cervical⁸.

Os HPV de alto risco (HR-HPV), tais como HPV-16 e HPV-18, que estão associados com os carcinomas anogenitais humanos codificam dois principais oncogenes (E6 e E7)⁹. A integração do DNA do HPV no cromossomo hospedeiro é crucial para a persistência viral e para os efeitos cancerígenos. A integração de DNA viral ocorre com os tipos de alto risco e leva à excedente expressão de duas oncoproteínas virais E6 e E7. Estas proteínas em combinação com E5 interagem com genes supressores tumorais (p53 e pRb) e promovem o desequilíbrio do ciclo celular, assim contribuindo para a imortalização e transformação das células infectadas¹⁰.

Os métodos tradicionais de diagnóstico viral, tais como microscopia eletrônica, cultura de células e certos métodos imunológicos não são adequados para a detecção de HPV. É válido ressaltar que o HPV não pode ser cultivado em culturas de células. Os métodos importantes para diagnosticar a infecção pelo HPV são: teste de ácido acético, colposcopia, biópsia, teste de DNA (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, *Southern Blot*, *Hibridização in situ* e captura híbrida) e a citologia oncótica (Papanicolaou)¹¹. O teste de biologia molecular (DNA) para detecção e genotipagem do HR-HPV em amostras cervicais tem uma ótima sensibilidade para detectar lesões pré-cancerígenas¹².

O presente estudo tem por intuito apresentar informações relevantes à classe médica no que diz respeito ao rastreio primário do câncer cervical, assim tendo como objetivos, determinar a prevalência de infecções por HPV na população investigada, realizar a associação entre os métodos diagnósticos, através dos achados da Citologia em Meio Líquido (CML) com a análise molecular de DNA do HR-HPV, envolvendo a genotipagem do HPV-16 e HPV-18 pelo sistema *cobas® HPV Test*, bem como verificar o comportamento viral em

mulheres que procuraram os serviços diagnósticos da instituição por mais de uma vez.

Materiais e métodos

Tipo de estudo

O estudo foi do tipo observacional, descritivo e de caráter retrospectivo. Foi realizado com pacientes que buscaram os serviços diagnósticos dos setores de anatomia patológica e biologia molecular da instituição Amaral Costa Medicina Diagnóstica, durante o período de março de 2013 a março de 2015.

Crítérios de seleção

Pacientes do sexo feminino e maiores de 18 anos de idade, que tiveram na guia de serviço profissional, solicitação para citologia oncótica preparada em base líquida juntamente com a detecção e genotipagem de HR-HPV por PCR.

Preparo e coleta do material dos pacientes

Foram utilizadas amostras de raspado endocervical colhidas em kit próprio para coleta: Solução PreservCyt. Para obtenção de um raspado endocervical adequado, utilizou-se um dispositivo (Cervex-Brush) com protocolo de instruções de coleta já padronizadas.

As pacientes receberam instruções de preparo antes da coleta do material. As recomendações foram: não é recomendável efetuar exame digital (toque), colposcopia ou assepsia prévia; é recomendável fazer abstinência sexual três dias antes da coleta; não usar creme/óvulo vaginal, ducha ou lavagem interna (endovaginal); não estar menstruada e não fazer ultrassonografia transvaginal ou colposcopia três dias antes da coleta.

Processamento das amostras

As amostras foram transportadas e armazenadas conforme instruções padronizadas, até o momento de seu processamento. As amostras cervicais

colhidas em Solução *PreservCyt*® possuem uma estabilidade em temperaturas entre 2 e 30°C durante um período máximo de 6 meses após a data da coleta.

Na anatomia patológica realizou-se a CML, um método diagnóstico em que as células cérvico-vaginais, após coletadas, são preservadas em uma solução conservante que também serve como meio para testes de biologia molecular para o HPV. O material celular é então levado ao equipamento *ThinPrep*® 2000 System (*Hologic, Inc*) para preparação e coloração das lâminas citológicas, melhorando assim a qualidade e o desempenho do método tradicional de Papanicolaou, uma vez que é totalmente automatizado.

Após preparação da lâmina, o médico patologista e/ou citotécnico responsável realizou a investigação para detectar a presença de atipias celulares, lesões precursoras (lesões escamosas de baixo e alto grau) ou câncer cervical, bem como todas as outras categorias citológicas definidas pelo Sistema Bethesda 2014^{13,14} para relatar diagnósticos citológicos cérvico-vaginal.

No setor de biologia molecular, o teste utilizado para detecção e genotipagem foi o *cobas*® HPV Test (*Roche Molecular Diagnostics*) que se baseia em dois processos principais: (1) preparação automática de amostras para extrair simultaneamente DNA celular e DNA-HPV; (2) amplificação por PCR de sequências do DNA alvo, usando pares de iniciadores complementares específicos para o HPV e a β -globina, e detecção em tempo real das sondas de detecção oligonucleotídicas específicas para o HPV e a β -globina marcadas com corante fluorescente e clivadas.

A extração, amplificação e detecção simultâneas da β -globina no *cobas*® HPV Test HPV monitoriza o todo o processo do teste. O reagente de Mistura Principal (Master MIX – MMX) do *cobas*® HPV Test contém pares de iniciadores e sondas específicas para o DNA dos 14 tipos de HR-HPV e da β -globina. A detecção de DNA amplificado (amplicon) é então realizada durante o ciclo térmico utilizando sondas oligonucleotídicas marcadas com quatro corantes fluorescentes diferentes. Os sinais amplificados de 12 tipos de HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) são detectados utilizando o mesmo corante fluorescente, enquanto que os sinais do HPV-16, do HPV-18 e da β -globina são detectados, cada um com o seu próprio corante fluorescente específico.

Análise estatística

Para a realização da estatística descritiva e a elaboração de tabelas e gráficos demonstrando as prevalências, utilizou-se o *software Excell for Windows*, versão 2013.

Para a comparação de diferenças entre proporções foi realizado o teste Qui-quadrado (χ^2) de Pearson. Para investigar uma suposta associação entre o fator de risco (infecção por HPV de alto risco) e o desfecho (presença de alterações celulares precursoras e/ou tumorais invasivas), realizou-se a análise do Risco Relativo (RR). Para demonstrar a confiabilidade dos resultados da pesquisa e para identificar, se o RR encontrado representou um efeito na população e não apenas na amostra estudada, foi realizado o cálculo do Intervalo de Confiança (IC) com 95% de "chance" de o intervalo conter o verdadeiro valor. Consideraram-se como significativos, os resultados que apresentavam nível de significância $\leq 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi realizado pelo *software BioEstat*, versão 5.3.

Aspectos éticos e legais

Dispensou-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma vez que foram utilizados dados secundários dos pacientes que dependem única e exclusivamente da anuência da Instituição Amaral Costa Medicina Diagnóstica.

Resultados

No período de março de 2013 a março de 2015, um total de 1.042 amostras cervicais foram analisadas. A idade da população estudada variou de 18 a 78 anos de idade. Do total de amostras, 4 esfregaços foram insatisfatórios para avaliação microscópica diagnóstica acurada e 51 pacientes procuraram os serviços diagnósticos da instituição por mais de uma vez. As amostras que tiveram esfregaços insatisfatórios foram excluídas da análise por não oferecerem diagnóstico.

Considerando-se um total de 987 amostras (excluindo-se os resultados de 51 pacientes que retornaram pelo segundo momento ao laboratório e os 4

esfregaços insatisfatórios), observou-se uma prevalência de 38,50% (380/987) de mulheres na faixa etária entre 31 a 40 anos, 25,03% (247/987) com diagnóstico molecular detectável para HR-HPV, 5,47% (54/987) com presença de alterações morfológicas em células epiteliais na CML e 4,25% (42/987) apresentaram uma combinação de HR-HPV detectável com CML alterada (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das 987 mulheres de idade entre 18 a 78 anos com amostras cervicais colhidas no período de março de 2013 a março de 2015.

Características descritivas	n	%
Total	987	100,00
Idade (anos)		
18 - 20	35	3,55
21 - 30	272	27,56
31 - 40	380	38,50
41 - 50	191	19,35
51 - 60	78	7,90
> 60	31	3,14
Diagnóstico molecular do HR-HPV^a		
Detectável	247	25,03
Não detectável	740	74,97
Diagnóstico citopatológico (CML)		
NILM ^b	933	94,53
ASC-US ^c	42	4,26
ASC-H ^d	2	0,20
LSIL ^e	10	1,01
CML combinada com resultados de HR-HPV		
Citologia NILM e HR-HPV não detectável	728	73,76
Citologia NILM e HR-HPV detectável	205	20,77
Citologia alterada e HR-HPV não detectável	12	1,22
Citologia alterada e HR-HPV detectável	42	4,25

^a HPV-16, HPV-18 e Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). ^b Negativa para lesão intraepitelial ou malignidade. ^c Atipias de significado indeterminado em células epiteliais escamosas, possivelmente não neoplásicas. ^d ASC, não se podendo afastar uma lesão intraepitelial escamosa de alto grau. ^e Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

Das 54 amostras com diagnóstico citológico alterado, 42 pacientes (77,78%) apresentaram atipias de significado indeterminado em células epiteliais escamosas, possivelmente não neoplásicas (ASC-US), 2 pacientes (3,70%) apresentaram ASC, não se podendo afastar uma lesão intraepitelial escamosa

de alto grau (ASC-H) e em 10 pacientes (18,52%) observou-se lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL).

A **Tabela 2** mostra a frequência do comportamento viral em mulheres que retornaram em um segundo momento ao laboratório. Observou-se que 37,25% (19/51; IC95% 24,00% - 50,50%) das pacientes foram diagnosticadas com uma persistência viral. É válido salientar a persistência viral por 6 meses ou mais em 16 mulheres, com 5 pacientes evoluindo de uma CML normal para uma CML alterada. Das cinco pacientes, duas evoluíram (uma com persistência viral de 9 meses e outra de 13 meses) de uma CML normal para um diagnóstico citopatológico de LSIL.

A progressão viral de HR-HPV não detectável para HR-HPV detectável foi constatada em 6 mulheres. A janela de progressão variou de 8 a 17 meses. Destas, apenas uma paciente apresentou CML alterada com diagnóstico citopatológico de ASC.

Tabela 2 - Frequência do comportamento viral em mulheres que retornaram em um segundo momento ao laboratório.

Comportamento viral (n=51)	n	%	IC 95 %
Persistência viral	19	37,25	24,00 – 50,50
Persistência não detectável	18	35,29	22,20 – 48,40
Regressão viral	8	15,69	5,70 – 25,70
Progressão viral	6	11,76	2,90 – 20,60

A detecção do DNA para HR-HPV está significativamente associada com a presença de alterações morfológicas em células epiteliais nas amostras cervicais analisadas ($\chi^2 = 81,78$; $p < 0,0001$). O RR de 10.49, muito significativo ($p < 0,0001$), determina um aumento relativo do risco (ARR) de 949,00% e um aumento absoluto do risco (AAR) de 15,38%. O número necessário para causar um evento desfavorável em um determinado tempo (NNH) é de sete (7) indivíduos. Em outras palavras, de cada 7 mulheres com HR-HPV detectável pela biologia molecular, espera-se que uma apresente alterações morfológicas em células epiteliais pertinente, assim podendo evoluir para o câncer cervical (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Associação entre a infecção pelo HR-HPV detectado por biologia molecular e a presença de alterações morfológicas em células epiteliais.

Detecção e genotipagem do HR-HPV ^a	Alteração celular (CML ^b)		Total
	Presença	Ausência	
Detectável	42	205	247
Não detectável	12	728	740
Total	54	933	987

$\chi^2=81,78$; $p<0,0001$; $RR^c=10,49$; IC 95% (5,61-19,59); $ARR^d=949,00\%$; $AAR^e=15,38\%$; $NNH^f=7$.

^a HPV-16, HPV-18 e Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). ^b Citologia em meio líquido. ^c Risco relativo. ^d Aumento relativo do risco. ^e Aumento absoluto do risco. ^f Número necessário para causar um evento desfavorável em um determinado tempo.

A prevalência de infecções do HR-HPV em amostras cervicais foi de 247 (25,03%). As prevalências de infecções simples e infecções múltiplas (coinfecção por mais de um tipo de HPV) foram de 85,83% e 14,17%, respectivamente. Conforme ilustrado na **Fig. 1**, as prevalências de infecções por HR-HPV distribuem-se da seguinte maneira: Outros 12 tipos de HPV de alto risco, incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (181/73,28%), HPV-16 (28/11,34%), HPV-18 (3/1,21%) e coinfecção (35/14,17%) - 12 Outros HR-HPV + HPV-16; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-18; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-16 + HPV-18; ou HPV-16 + HPV-18. Com relação as infecções múltiplas de HR-HPV, observa-se que o HPV-16 e outros 12 tipos de HR-HPV foram os mais comuns (9,72%) nas coinfeções. Houveram 3 casos (1,21%) em que pacientes apresentaram coinfecção com o HPV-16, HPV-18 e outros 12 tipos de HR-HPV.

Entre as 987 mulheres com a faixa etária de 18 a 78 anos de idade que tiveram amostras cervicais colhidas para análise citológica e molecular, a prevalência global de HR-HPV (14 tipos) detectado com o teste cobas HPV foi de 25,03% e as taxas de HPV-16, HPV-18, 12 outros genótipos de HR-HPV e coinfecção foram de 2,84% (28/987), 0,30% (3/987), 18,34% (181/987) e 3,55% (35/987), respectivamente (**Tabela 4**). Mais da metade das mulheres (60%; 21/35) participantes do estudo, com faixa etária entre 18 a 20 anos foram diagnosticadas pela biologia molecular com HR-HPV detectável.

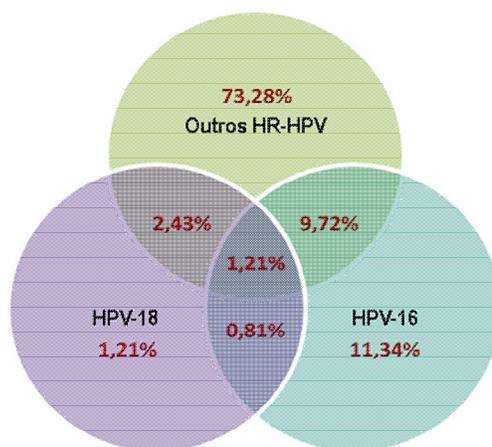


Fig. 1 - Prevalência dos tipos de HR-HPV em infecções simples e múltiplas nas 247 amostras com DNA-HPV detectado.

Outros HR-HPV: Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Infecções múltiplas: 12 Outros HR-HPV + HPV-16; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-18; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-16 + HPV-18; ou HPV-16 + HPV-18.

A prevalência de HR-HPV diminuiu com o aumento da idade, apesar de ser observado uma taxa de 16,13% (5/31) em mulheres com idade superior a 60 anos. Dentre elas, uma com 72 anos de idade apresentou HR-HPV. Infecções múltiplas apresentaram-se mais prevalentes em mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos, com uma taxa de prevalência de 20% (7/35) na faixa de idade entre 18 a 20 anos e 7,35% (20/272) na faixa entre 21 a 30 anos de idade. Como já demonstrado **na Fig. 1**, três mulheres (1,21%) foram diagnosticadas com pelo menos três HR-HPV (incluso HPV-16, HPV-18 e outros 12 tipos de HPV de alto risco). As idades foram de 22, 31 e 39 anos.

Tabela 4 - Prevalência (%) do HR-HPV de acordo com a faixa etária.

Faixa etária (anos)	Total	HPV de alto risco oncogênico - Detecção e Genotipagem				
		HR-HPV ^a	HPV-16	HPV-18	12 outros HR-HPV ^b	Coinfecção ^c
18 - 20	35	60,00	2,86	0,00	37,14	20,00
21 - 30	272	36,40	4,04	0,37	24,63	7,35
31 - 40	380	23,95	3,68	0,53	17,63	2,11
41 - 50	191	12,04	0,52	0,00	11,52	0,00
51 - 60	78	10,26	1,28	0,00	8,97	0,00
> 60	31	16,13	0,00	0,00	16,13	0,00
Todos	987	25,03	2,84	0,30	18,34	3,55

^a HPV-16, HPV-18, Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) e coinfecção. ^b Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). ^c 12 Outros HR-HPV + HPV-16; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-18; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-16 + HPV-18; ou HPV-16 + HPV-18.

Entre as 205 mulheres com citologia NILM e diagnóstico molecular com detecção do DNA para HR-HPV, a prevalência dos 12 outros tipos de HR-HPV foi de 74,15%, do HPV-16, HPV-18 e da coinfeção foi de 10,24%, 1,46% e 14,15%, respectivamente. Quanto ao grupo das 42 mulheres com citologias alteradas (incluindo ASC-US, ASC-H e LSIL) e diagnóstico molecular com HR-HPV detectável, a prevalência dos 12 outros tipos de HR-HPV foi de 69,05%, do HPV-16, HPV-18 e da coinfeção foi de 16,67%, 0,00% e 14,29%, respectivamente (**Tabela 5**). É notável a maior prevalência do HPV-16 (13/103; 12,62%) no grupo de mulheres com idade superior a 30 anos que apresentaram citologia NILM. Já no grupo com o diagnóstico de citologia alterada, a taxa de prevalência do HPV-16 (4/18; 22,22%) foi maior na faixa etária que compreende mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos.

Não foi observada a detecção de HPV-18 em mulheres com citologia alterada. A coinfeção apresentou-se mais prevalente no grupo de mulheres com idade inferior ou igual a 30 anos, tanto naquelas que foram diagnosticadas com citologia NILM (23/102; 22,55%), quanto nas que tiveram alteração morfológica em células epiteliais (4/18; 22,22%).

Tabela 5 - Prevalência (%) do HR-HPV em mulheres com faixa etária ≤ 30 anos e > 30 anos que apresentaram citologia NILM e citologia alterada.

Faixa etária	Total	HPV de alto risco oncogênico - Detecção e Genotipagem			
		HPV-16	HPV-18	12 outros HR-HPV ^c	Coinfeção ^d
Citologia NILM^a					
≤ 30 anos	102	7,84	0,98	68,63	22,55
> 30 anos	103	12,62	1,94	79,61	5,83
Todos	205	10,24	1,46	74,15	14,15
Citologia alterada^b					
≤ 30 anos	18	22,22	0,00	55,56	22,22
> 30 anos	24	12,50	0,00	79,17	8,33
Todos	42	16,67	0,00	69,05	14,29

^a Negativa para lesão intraepitelial ou malignidade. ^b Inclui ASC-US (Atipias de significado indeterminado em células epiteliais escamosas, possivelmente não neoplásicas), ASC-H (ASC, não se podendo afastar uma lesão intraepitelial escamosa de alto grau) e LSIL (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau). ^c Outros 12 tipos de HPV de alto risco (incluindo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). ^d 12 Outros HR-HPV + HPV-16; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-18; ou 12 Outros HR-HPV + HPV-16 + HPV-18; ou HPV-16 + HPV-18.

Discussão

Este estudo teve por objetivo determinar a prevalência de infecções por HPV, bem como realizar a associação entre os métodos diagnósticos através dos achados da CML e da análise molecular de DNA do HR-HPV e genotipagem do HPV-16 e HPV-18 em pacientes que buscaram os serviços diagnósticos dos setores de anatomia patológica e biologia molecular da instituição Amaral Costa Medicina Diagnóstica, durante o período de março de 2013 a março de 2015. Com os resultados descritos, pretende-se fornecer informações relevantes à classe médica no que diz respeito ao rastreio primário do câncer cervical.

A infecção genital por HPV é uma das IST's mais comuns. Estima-se que 10% das mulheres com achados citológicos normais apresentem uma infecção detectável de HPV e aproximadamente 291 milhões de mulheres carregam o DNA do HPV^{15,16}. Desde a década de 70, pesquisadores começaram a investigar, descrever e associar o papel da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer cervical¹⁷⁻¹⁹. Infelizmente, a maioria das regiões do Brasil ainda demonstram altas taxas de mortalidade, sendo o câncer cervical classificado como o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras²⁰.

Ao analisarem as infecções por HPV tipo-específicas em mulheres de idade entre 14 a 95 anos com citologia normal e anormal, das cidades de São Paulo e Barretos (Brasil), os autores observaram que das 665 amostras analisadas, 323 (48,6%) tiveram HPV detectável. Infecções simples foram observadas em 65% (210/323) dos casos, enquanto 59 (18%) tiveram coinfeção por 2 tipos de HPV e 34 (11%) por três tipos²¹. Tais dados estão em consonância com os observados em nosso estudo.

Evidenciou-se no nosso estudo uma forte associação significativa ($\chi^2=81,78$; $p<0,0001$) da detecção para o DNA do HR-HPV com a presença de alterações morfológicas em células epiteliais nas amostras cervicais analisadas. De cada 7 mulheres com diagnóstico molecular em que o HR-HPV foi detectável, uma possui um risco relativo elevado de apresentar alterações morfológicas em células epiteliais pertinente, podendo evoluir para câncer cervical.

Os resultados do estudo ATHENA, um estudo prospectivo, multicêntrico para triagem do câncer cervical, envolvendo mais de 47.000 mulheres nos EUA,

demonstrou que 1 em cada 10 mulheres com detecção do HPV 16 e/ou 18 pelo teste cobas HPV realmente tinham pré-câncer cervical, embora elas apresentassem resultados normais com o exame de Papanicolaou²². Neste fato reside a importância de combinar a citologia com o teste de HPV, pois permite concentrar-se nas poucas mulheres que necessitam de tratamento agressivo, assim evitando colposcopias desnecessárias, como também permite tranquilizar a grande maioria das mulheres que estão em risco muito baixo. Esta associação permite um rastreio mais efetivo no seguimento de mulheres e previne o aumento na incidência de lesões de alto grau, quando comparado com a triagem realizada somente pela citologia.

Um programa de vigilância no norte da Itália adotou o teste de DNA do HPV como uma ferramenta de rotina no seguimento das mulheres tratadas pela NIC2+ (Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2). Os dados deste estudo prospectivo de 5 anos com 310 pacientes tratadas como NIC2+ e submetidas a testes de DNA de HPV, citologia e colposcopia aos 6 meses após o tratamento, demonstrou que nenhuma das 172 (55%) mulheres com HPV não detectável aos 6 meses após tratamento apresentaram NIC2+ residual/recorrente durante o período de vigilância. Em contraste, entre as 138 (45%) mulheres HPV-detectável, 17 casos de NIC2+ residual/recorrente (17/138; 12,3%) foram identificadas entre 6 e 24 meses²³. Isto reforça que o rastreio primário do HPV com o teste cobas HPV identifica a doença no mais alto grau quando comparado com a citologia oncológica isolada e mantém a eficiência de triagem. O teste de DNA do HPV identifica de forma eficaz mulheres sem a doença e está evoluindo como teste de triagem para o câncer cervical. A ferramenta de biologia molecular no diagnóstico do HR-HPV vem se mostrando eficaz na detecção de infecções precoces que podem progredir para lesões precursoras.

Vários outros estudos destacam a forte associação e o papel fundamental da infecção do HR-HPV com o desenvolvimento de lesões intraepiteliais (LSIL e HSIL) e câncer cervical²⁴⁻²⁸. Em todos os trabalhos, as anormalidades citológicas apresentam-se mais prevalentes em pacientes com diagnóstico molecular detectável para HR-HPV.

A persistência e progressão viral é um passo importante na história natural da infecção do HR-HPV para o desenvolvimento de lesões precursoras e o câncer cervical. Foi observado no nosso estudo que 16 mulheres foram diagnosticadas com uma persistência viral de seis meses ou mais. Destas, cinco

apresentaram alteração celular no segundo momento, com duas evoluindo para um diagnóstico citopatológico de LSIL. Estudos têm demonstrado que, apesar da infecção pelo HPV oncogênico ser fator fundamental, são necessários também outros fatores (imunossupressão, multiparidade, início precoce da vida sexual, uso de anticoncepcionais orais, tabagismo, alcoolismo, coinfeção com outras IST's, carga viral, etc.) para a progressão da lesão e/ou câncer cervical²⁹.

Os dados de um trabalho realizado com mulheres do Peru de diversas áreas urbanas utilizando o teste cobas HPV corroboram os encontrados em nosso estudo. Iwasaki et al. (2014)³⁰ tinham como objetivo determinar a prevalência de HPV-16, HPV-18 e outros HR-HPV (*pool* de 12 genótipos). Do total de 2.247 amostras de pacientes do sexo feminino com idades entre 17 a 79 anos testados, o HPV-HR foi detectado em 775 (34,49%) amostras. Tanto em infecções únicas como em múltiplas infecções, outros 12 tipos de HR-HPV foram mais prevalentes do que o HPV-16 e o HPV-18.

A prevalência de HR-HPV diminuiu com o aumento da idade e mais da metade das mulheres (60%; 21/35) participantes do estudo, com faixa etária entre 18 a 20 anos foi diagnosticada pela biologia molecular com HR-HPV detectável. Este dado demonstra que mulheres com idade mais jovens são um importante grupo de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Baseado nisto, há a necessidade de planos de controle para o rastreio primário que englobem o diagnóstico citopatológico e molecular como estratégias diagnósticas de prevenção. Isto também auxilia o direcionamento e implementação de mais políticas públicas de saúde como uma maior abrangência e distribuição de vacinas para os principais grupos de risco da região.

Outros trabalhos também descreveram a diminuição da prevalência do HR-HPV com o aumento da idade. No estudo conduzido por Martins TR et al. (2016), a prevalência de infecção pelo HPV diminuiu com o envelhecimento ($p < 0,001$). Em mulheres com menos de 31 anos, a prevalência do DNA do HPV foi de 58,2% (92/158), diminuindo para 52,3% (116/222) em mulheres entre 31 e 45 anos e 40,4% (115/285) em mulheres com idade superior a 45 anos²¹. Em um outro estudo foi observado que a tanto as anormalidades citológicas como a detecção do HR-HPV diminuíram com o aumento da idade²².

Os dados do estudo realizado em mulheres de uma cidade do interior do sul do Brasil, onde investigaram fatores epidemiológicos relacionados à

infecção pelo HPV e avaliaram as frequências de persistência viral e lesões do câncer cervical estão em consonância com os nossos resultados. Neste estudo, os autores concluíram que a infecção por HPV estava associada a idade jovem (<30 anos, $p=0,028$)³¹. Rositch et al., (2013)³² também observaram que a prevalência de HR-HPV e anormalidades cervicais diminuíram significativamente com o aumento da idade. A prevalência de HPV-HR foi de 50% entre as mulheres mais jovens com anormalidades, diminuindo para 20% de detecção do HR-HPV entre mulheres com 50 a 54 anos e em mulheres de 55 a 60 anos não foram detectadas anormalidades.

Em abril de 2014 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou o teste cobas HPV pela *Roche Molecular Systems, Incorporated, Pleasanton, Califórnia* como um método autônomo para triagem do câncer cervical. (<https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm394773.htm>). O teste cobas HPV é um teste de DNA de HPV baseado em PCR que está entre aqueles com desempenho satisfatório em termos de sensibilidade e especificidade para a detecção de lesões cervicais de alto grau³³.

Ao avaliarem o desempenho do HR-HPV com a genotipagem do HPV-16 e HPV-18 como método para triagem primária do câncer cervical, em comparação com a CML, um grupo de estudo conduzido pela “*Hellenic Real life Multicentric Cervical Screening*” (HERMES) recrutaram 4.009 mulheres, com idade entre 25 a 55 anos. O sistema utilizado para detecção e genotipagem do HR-HPV foi o cobas 4800 (Roche). No presente trabalho é mostrado que o teste cobas HPV tem sensibilidade superior a citologia (ASC-US ou “*worse*”) na detecção de NIC2+ e NIC3+. A citologia teve uma sensibilidade de apenas 53,7% e 64,3% respectivamente, enquanto o teste de HPV utilizando o sistema cobas apresentou uma sensibilidade de 100% para ambos os limiares histológicos. O grupo recomenda que o teste com genotipagem do HPV-16/HPV-18 poderia representar uma metodologia mais precisa para o rastreamento do câncer cervical primário em comparação a CML, especialmente em mulheres mais com idade mais avançada³⁴.

Em 2011,³⁵ a Sociedade Americana do Câncer, a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical e a Sociedade Americana de Patologia Clínica atualizaram as diretrizes de triagem para a detecção precoce do câncer cervical e suas lesões precursoras. As estratégias de rastreio recomendadas foram a citologia e o coteste (citologia em combinação com teste de HR-HPV).

Especialistas de várias sociedades e colegiados foram convocados para fornecer e divulgar orientação provisória para o rastreio primário do HR-HPV³⁶.

Um estudo foi realizado com 47.208 mulheres recrutadas, incluindo 32.260 mulheres de 30 anos ou mais com citologia negativa, em que todas as mulheres com DNA detectável para HR-HPV (n=4.219) mais um subconjunto de mulheres com HR-HPV não detectados (n=886) foram encaminhadas para colposcopia e biópsia. O risco absoluto estimado de NIC2+ ou “*worse*” em mulheres HPV-16+ e / ou HPV-18+ foi de 11,4% (intervalo de confiança de 95% [IC], 8,4%-14,8%) em comparação com 6,1% (IC95% 4,9% - 7,2%) em HR-HPV+ e 0,8% (IC95%, 0,3% - 1,5%) em mulheres com HR-HPV não detectável. Essas análises validam as diretrizes da Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical para genotipagem de HPV-16/HPV-18, que recomendam encaminhamento para colposcopia, mulheres com detecção do HPV-16/HPV-18 e citologia negativa³⁷.

Existem diretrizes de triagem para o câncer cervical que apresentam um resumo das principais recomendações atuais³⁸.

O método de rastreamento do câncer do colo do útero no Brasil é o exame citopatológico, que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos e que já tiveram atividade sexual. A rotina recomendada para o rastreamento no Brasil é a repetição do exame Papanicolaou a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano. A repetição em um ano após o primeiro teste tem como objetivo reduzir a possibilidade de um resultado falso-negativo na primeira rodada do rastreamento. Não devem ser incluídas no rastreamento mulheres sem história de atividade sexual ou submetidas a histerectomia total por outras razões que não o câncer do colo do útero³⁹.

A citologia oncótica, incluindo o esfregaço convencional (inicialmente proposto em 1941 pelo médico grego George Nicholas Papanicolaou⁴⁰) e a CML, é um método bem sucedido para o rastreio do câncer e ainda é recomendado como o teste exclusivo para mulheres de 21 a 29 anos de idade. Uma vez que o HPV foi estabelecido como o principal fator de risco para câncer cervical, sua detecção melhorou a sensibilidade do rastreio. O coteste é recomendado para mulheres de 30 a 64 anos de idade e é o método de rastreio mais eficaz para a detecção precoce do câncer cervical⁴¹. A recomendação de um novo algoritmo como opção de rastreio primário utiliza a alta sensibilidade da

ferramenta de biologia molecular na detecção de DNA do HR-HPV, juntamente com a estratificação de risco embutida na genotipagem do HPV-16/HPV-18 e a alta especificidade da citologia para um equilíbrio ideal no rastreamento do câncer cervical.

Existem estudos recentes que recomendam um novo algoritmo, sendo a triagem realizada pelo teste de DNA-HPV (detecção e genotipagem do HR-HPV) como rastreamento primário para o câncer cervical. Este novo algoritmo sugere o direcionamento à realização da colposcopia, caso ocorra a detecção para um dos principais biomarcadores moleculares (genotipagem do HPV-16/HPV-18, expressão de mRNA dos genes E6/E7 e expressão das proteínas p16^{INK4A}/Ki-67) que mostram-se como fatores de risco essenciais para o desenvolvimento do câncer cervical^{36,42}.

O teste cobas 4800 HPV cumpre todos os requisitos definidos nas diretrizes internacionais para considerar um ensaio clinicamente validado para fins de rastreamento⁴³. Quando comparado com outro teste de biologia molecular, o teste cobas 4800 HPV demonstrou maior sensibilidade e especificidade na detecção e genotipagem do HR-HPV. O teste cobas também apresentou um nível mais baixo de reatividade cruzada com genótipos de HPV de baixo risco, evidenciado por poucos casos “falso-positivos”⁴⁴.

O teste cobas 4800 HPV mostra-se como uma ferramenta de biologia molecular útil no diagnóstico e monitoramento das infecções por HPV. Esta ferramenta torna-se parte de uma estratégia diagnóstica de prevenção para o desenvolvimento de lesões precursoras e o câncer cervical propriamente dito.

Ainda há necessidade de mais estudos que demonstrem a utilização de rotina da ferramenta de biologia molecular na detecção e genotipagem do HR-HPV como uma opção eficaz e viável para o rastreamento primário do câncer cervical. O objetivo primordial é oferecer dados com a finalidade de propor melhorias na elaboração de políticas públicas em saúde no que tange estratégias diagnósticas de prevenção. Nisto inclui políticas voltadas para ampliar a distribuição de vacinas nas populações de maior risco.

Baseado nisto, está a importância de estudos que visem verificar a prevalência e distribuição da infecção de múltiplos genótipos de HPV em coinfeções e que também fortaleça a evidência do teste molecular para HPV como requisito imprescindível no algoritmo para rastreamento do câncer cervical. O entendimento do perfil da infecção por um ou mais tipos de HR-HPV, juntamente

com a prova diagnóstica da citologia auxiliará no direcionamento de uma melhor conduta para a prevenção de possíveis lesões relacionadas ao desenvolvimento do câncer cervical. Como já mencionado, são necessários mais trabalhos que demonstrem os reais benefícios, custos e impactos da utilização de um novo algoritmo no rastreio primário do câncer cervical. Mesmo com todas as evidências já propostas, a citologia convencional ainda mostra-se muito importante no rastreio.

O presente trabalho teve por intuito apresentar informações relevantes à classe médica, no que diz respeito ao rastreio de doentes com resultados das citologias alteradas (ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL) e/ou presença do vírus HPV. Estas informações, juntamente com a avaliação da conduta clínica das lesões com alto potencial oncogênico, outros fatores de risco e diretrizes profissionais, podem ser utilizadas para conduzir a gestão dos doentes que poderão evoluir ao câncer cervical.

Em conclusão, por ser o HPV altamente infeccioso e facilmente transmitido, é de fundamental importância a realização de estudos que mostrem o valioso instrumento de diagnóstico que é a associação dos métodos de biologia molecular e anatomia patológica para o rastreio e consequente prevenção de possíveis lesões precursoras do câncer e de lesões tumorais invasivas, bem como prevenir a disseminação do vírus por pessoas portadoras, assim reduzindo as taxas de mortalidade ocasionadas por câncer cervical.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. WHO. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Fact sheet N°380. World Health Organization. Update June 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em: 19 dezembro de 2016.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108.

3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2016 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 05 de junho de 2016.
4. Eileen MB. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.
5. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn, L. Review: Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S:S43-51.
6. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27.
7. Muñoz N, Xavier FB, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2003;348:518-27.
8. Yugawa T, Kiyono T. Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses. *Uirusu.* 2008;58(2):141-54.
9. Howley PM, Münger K, Romanczuk H, Scheffner M, Huibregtse JM. Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses. *Princess Takamatsu Symp.* 1991;22:239-48.
10. Prétet JL, Charlot JF, Mouglin C. Virological and carcinogenic aspects of HPV. *Bull Acad Natl Med.* 2007;191(3):611-23.
11. Dixit R, Bhavsar C, Marfatia YS. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis.* 2011;32(1):50–52.
12. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579-88.
13. Nayar R, Wilbur DC. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes*, ed 3. New York, Springer 2015.
14. Nayar R, Wilbur DC. *The Pap test and Bethesda 2014.* *Cancer Cytopathol.* 2015;123(5):271-81.
15. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005;366(9490):991-8.

16. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-9.
17. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13:650-656.
18. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976;36:794.
19. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1977;78:1-30.
20. Lorenzi AT, Syrjänen KJ, Longatto-Filho A. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. *Virology J.* 2015;12:112.
21. Martins TR, Oliveira CM, Rosa LR, et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. *Virology Journal.* 2016;13:138.
22. Wright TC Jr, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(1):46.e1-46.e11.
23. Garutti P, Borghi C, Bedoni C, et al. HPV-based strategy in follow-up of patients treated for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia: 5-year results in a public health surveillance setting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017;210:236-241.
24. Dobec M, Bannwart F, Kilgus S, Kaeppeli F, Cassinotti P. Human papillomavirus infection among women with cytological abnormalities in Switzerland investigated by an automated linear array genotyping test. *J Med Virol.* 2011;83(8):1370-6.
25. de Azevedo AE, Carneiro FP, Neto FF, et al. Association between human papillomavirus infection and cytological abnormalities during early follow-up of invasive cervical cancer. *J Med Virol.* 2012;84(7):1115-9.
26. Kim HS, Kim TJ, Lee IH, Hong SR. Associations between sexually transmitted infections, high-risk human papillomavirus infection, and abnormal cervical Pap smear results in OB/GYN outpatients. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(5):e49.

27. Zhao J, Guo Z, Wang Q, et al. Human papillomavirus genotypes associated with cervical precancerous lesions and cancer in the highest area of cervical cancer mortality, Longnan, China. *Infectious Agents and Cancer*. 2017;12:8.
28. Bhatta MP, Johnson DC, Lama M, Aryal S, Lhaki P, Shrestha S. High-risk human papillomavirus infection and abnormal cervical cytology among Nepali and Bhutanese refugee women living in eastern Nepal. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):73.
29. Dempsey AF. Human Papillomavirus: The Usefulness of Risk Factors in Determining Who Should Get Vaccinated. *Rev Obstet Gynecol*. 2008;1(3): 122-128.
30. Iwasaki R, Galvez-Philpott F, Arias-Stella J Jr, Arias-Stella J. Prevalence of high-risk human papillomavirus by cobas 4800 HPV test in urban Peru. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(5):469-72.
31. Coser J, Boeira Tda R, Wolf JM, Cerbaro K, Simon D, Lunge VR. Cervical human papillomavirus infection and persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2016;20(1):61-8.
32. Rositch AF, Silver MI, Burke A, et al. The correlation between hpv positivity and abnormal cervical cytology differs by age among perimenopausal women. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17(1):38–47.
33. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British journal of cancer*. 2013;108:908-913.
34. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T, et al. Primary screening for cervical cancer based on high-risk human papillomavirus (HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology. *PLoS One*. 2015;10(3): e0119755.
35. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. 2012;137:516-542.
36. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance. *Gynecol Oncol*. 2015;136(2):178-82.
37. Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with

- high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(4):578-86.
38. Davis M, Feldman S. Making sense of cervical cancer screening guidelines and recommendations. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(12):55.
39. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
40. Papanicolaou GN, Traut HF. The Diagnostic Value of Vaginal Smears in Carcinoma of the Uterus. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1941;42:193.
41. Mitteldorf CATS. Cervical cancer screening: from Pap smear to future strategies. *J Bras Patol Med Lab.* 2016;52(4):238-245.
42. Tornesello ML, Buonaguro L, Giorgi-Rossi P, Buonaguro FM. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int.* 2013;2013:519619.
43. Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3983-5.
44. Cui M, Chan N, Liu M, et al. Clinical performance of Roche Cobas 4800 HPV Test. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):2210-1.