

ADRIANA TARLÁ LORENZI

***careHPV™* - TESTE DE CAPTURA HÍBRIDA EM UNIDADE MÓVEL PARA MELHORIA DO
PROGRAMA DE RASTREIO DO CÂNCER CERVICAL EM ÁREAS RURAIS E REMOTAS
BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

**Barretos, SP
2015**

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

A aluna teve suporte financeiro (Bolsa-Auxílio) do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em HPV (INCT-HPV), através dos auxílios da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – processo número 573799/2008-3) e da FAPESP (processo número 2008/57889-1).

A aluna foi contemplada com Bolsa modalidade SWE (Doutorado Sanduíche) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), para realização de aprofundamento teórico-prático, pelo processo número 203348/2014-1.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado parte das análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

À luz da minha vida: Minha Família!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus e Nossa Senhora.

Ao meu pai **Luiz Carlos** e à minha mãe **Carmen Cecília**, pelo exemplo de vida, pelo amor dedicado à nossa família, por estarem sempre presentes e de braços abertos; por me ensinar (e aos meus irmãos) a sempre lutar por aquilo que sonhamos e principalmente, pelo incentivo e apoio em mais este desafio na minha vida. Vocês são o meu porto seguro!

Agradeço aos meus irmãos **Fernanda**, **Luciana** e **Marcelo**; aos meus cunhados **Marcelo** e **Dênis**, e minha cunhada **Carla** por estenderem as mãos nos momentos mais difíceis, pelo amor, paciência... E companhia em todas as horas! E claro, aos meus sobrinhos **Ana Cecília**, **Bruna**, **Guilherme**, **Maria Luiza**, **Melissa**, (e **Beatriz**) pelo amor incondicional e pela energia (sempre) renovadora!

Ao meu querido mentor e amigo, **Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho**, por abrir as portas para esse mundo fascinante da pesquisa em HPV. Obrigada pelo entusiasmo, pela amizade, pela parceria, pelos ensinamentos, pelas oportunidades de crescimento e principalmente, por toda confiança no meu profissionalismo.

Ao **Dr. Rui Reis** e **Dr. André Lopes Carvalho**, pela oportunidade de fazer parte do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

Ao **Dr. José Humberto Fregnani** e **Dr. Cristovam Scapulatempo Neto** pelos ensinamentos, apoio e incentivo durante toda jornada.

Aos meus queridos amigos **Adriana Cruvinel**, **Cecília Formagio**, **Emilze Mafra**, **Juliana Levy Daher**, **Jonatha Lopes** e **Renato Oliveira**, que estiveram por perto (ou quase) durante esses anos de preparo, estresses, alegrias e SUPERAÇÕES!

Aos amigos de trabalho **Júlio César Possatti**, **Márcio Antoniazzi**, **Raphael Haikel Junior** e **Carlos Eduardo Goulart** pela amizade, atenção e por todo suporte para a obtenção das amostras e acompanhamento das nossas pacientes.

Aos membros da banca de qualificação, **Prof. Dr. José Eduardo Levi** e **Prof. Dr. Henrique Silveira**, pelo incentivo, pelas críticas e sugestões durante o desenvolvimento desta tese.

À **Cíntia Batista, Estela Silva, Monique Amêndola, Paula Pastrez e Vânia Sammartino** pelo apoio e amizade.

A todos os envolvidos do Departamento de Prevenção, que tiveram muita paciência e comprometimento para o sucesso desse estudo. Em especial à **D. Creuza, Lidiane e Lilian**, pela amizade e pelo prazer de ter dividido experiências de trabalho e de vida. E ao **Eduardo**, pela amizade e pelo profissionalismo na estrada, levando-nos por esse Brasil à fora.

À **Dra. Luisa Lina Villa** e ao **Dr. José Eduardo Levi (Dudi)**, por todo aprendizado, incentivo, amizade e parceria ao longo desses anos de pesquisa.

À **Prof. Dra. Stina Syrjänen** e ao **Prof. Dr. Kari Syrjänen** pelo carinho, receptividade e pela oportunidade de ampliar meu conhecimento no “mundo HPV”, compartilhando experiências e ensinamentos durante minha estada na Universidade de Turku, Finlândia.

Ao grupo **INCT-HPV**, em especial **Laura Sichero, Emily Montosa, Silvaneide Ferreira, Raquel Hessel e Cynthia Pinheiro** pela atenção, comprometimento e suporte.

À Pós-Graduação, em especial à **Silvana Rodrigues e Brenda Honda**, pela paciência, atenção, profissionalismo e amizade.

Aos departamentos de suporte do Hospital de Câncer de Barretos (EPIT, CEP, NAP), em especial **Allini Mafra, Cleyton Zanardo, Daniela Girardi, Joyce Silva e Marcella Marchioretto**, e todos que de alguma forma puderam contribuir com esta pesquisa.

E claro, especialmente a todas as mulheres que se dispuseram voluntariamente a participar desta pesquisa, o meu muito obrigada!

“De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Câncer cervical ou câncer do colo de útero	3
2.2	Lesões Precursoras	4
2.2.1	Fatores de risco	5
2.3	<i>Papillomavirus</i> humano (HPV)	6
2.3.1	Classificação	7
2.3.2	O ciclo do <i>Papillomavirus</i> humano	7
2.4	Carcinogênese	8
2.4.1	Aquisição	9
2.4.2	<i>Clearance</i>	9
2.4.3	Persistência	9
2.5	Incidência do Câncer Cervical	11
2.5.1	Vacinação contra HPV	12
2.6	Prevenção do Câncer Cervical	13
2.6.1	<i>Screening</i> Citológico	14
2.6.2	<i>Screening</i> com teste HPV DNA	15
2.6.3	<i>Screening</i> no Brasil	19
2.6.4	Unidades Móveis do Hospital de Câncer de Barretos	20
3	JUSTIFICATIVA	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo Geral	23
4.2	Objetivos Específicos	23

5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	Desenho do estudo	24
5.2	População e Amostragem	24
5.2.1	Etapa Ambulatorial	25
5.2.2	Etapa Unidades Móveis	26
5.3	Análises Laboratoriais	28
5.3.1	Teste HPV DNA	28
5.3.2	Teste Papanicolaou	30
5.4	Critério de Avaliação	30
5.5	Identificação dos tipos de HPV	32
5.5.1	Extração de DNA	32
5.5.2	Tipagem dos HPVs	32
5.6	Análise Estatística	33
5.7	Aspectos Éticos	35
5.8	Financiamento	35
6	RESULTADOS	36
6.1	Amostras ambulatoriais (unidade fixa)	36
6.2	Amostras das unidades móveis	38
6.3	Desempenho do teste <i>careHPV™</i> nos diferentes cenários de coleta	40
6.3.1	Unidade Fixa	40
6.3.2	Unidades Móveis	41
6.3.3	Colposcopia e Biópsia	42
6.4	Modelos de Screening e <i>Gold Standard (GS)</i>	45
6.5	Tipagem dos HPVs	52
7	DISCUSSÃO	56

8	CONCLUSÕES	62
8.1	Geral	62
8.2	Específicas	62
REFERÊNCIAS		63
ANEXOS		72
Anexo A –	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	72
Anexo B –	Questionário aplicado na unidade fixa	74
Anexo C –	Questionário aplicado nas unidades móveis	75
Anexo D –	Material ilustrativo utilizado no grupo de auto coleta	76
Anexo E –	Carta-resposta enviada à participante com teste hr-HPV negativo	77
Anexo F –	Carta-resposta enviada à participante com teste hr-HPV positivo	78
Anexo G –	Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa	79
Anexo H –	Artigo original publicado	80
Anexo I –	Artigo de revisão publicado	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Incidência e mortalidade do câncer cervical na população mundial.	3
Figura 2 –	Incidência e mortalidade do câncer cervical na população brasileira.	4
Figura 3 –	Ciclo celular: progressão da infecção por HPV.	8
Figura 4 –	Ilustração da carcinogênese da infecção por HPV.	8
Figura 5 –	Organização do genoma do HPV.	10
Figura 6 –	Equipamento completo <i>careHPV™</i> .	18
Figura 7 –	Modelo de unidade móvel do Hospital de Câncer de Barretos.	20
Figura 8 –	Esquema de coletas executado na fase ambulatorial (unidade fixa).	25
Figura 9 –	Coletas executadas na fase das unidades móveis.	26
Figura 10 –	Interior da unidade móvel.	27
Figura 11 –	Dia de atendimento à população na unidade móvel.	27
Figura 12 –	Equipe de trabalho na unidade móvel.	27
Figura 13 –	Fluxograma das reações durante o processo de análise das amostras cérvico-vaginais – kit <i>careHPV™</i> .	29

Figura 14 –	Imagem do resultado final na tela do <i>controller</i> do sistema <i>careHPV™</i> .	29
Figura 15 –	Fluxograma do critério de avaliação utilizado para convocação das mulheres participantes do estudo.	31
Figura 16 –	Fluxograma de exclusão das amostras provenientes de mulheres com histerectomia.	34
Figura 17 –	Distribuição de mulheres com idade menor ou maior a 30 anos, com resultados alterados, divididas por grupo e unidade de coleta.	44
Figura 18 –	Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS1, separados por unidade, por grupo de coleta.	49
Figura 19 –	Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS2, separados por unidade, por grupo de coleta.	50
Figura 20 –	Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS3, separados por unidade, por grupo de coleta.	51
Figura 21 –	Distribuição geral dos genótipos de HPV detectados nas amostras cérvico-vaginais.	53
Figura 22 –	Distribuição do genótipo de infecção genital por HPV, de acordo com o grupo e a unidade de coleta.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos dados gerais da população estudada na unidade fixa, de acordo com os grupos de coleta (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	37
Tabela 2	Distribuição dos dados gerais da população estudada nas unidades móveis (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	39
Tabela 3	Resultados citológicos associados aos resultados do teste molecular <i>careHPV™</i> , na unidade fixa (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	40
Tabela 4	Resultados citológicos relativos ao teste <i>careHPV™</i> nas unidades móveis (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	41
Tabela 5	Frequências de comparecimento para os exames complementares, relativo àquelas mulheres que tiveram citologia alterada e/ou teste de HPV positivo (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	42
Tabela 6	Distribuição dos resultados obtidos nos exames complementares das mulheres que foram convocadas de acordo com o critério estabelecido (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	43
Tabela 7	Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro <i>GS1</i> (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	46
Tabela 8	Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro <i>GS2</i> (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).	47

- Tabela 9** – Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro GS3 (Hospital de Câncer de Barretos, 2012). 48
- Tabela 10** – Distribuição dos resultados obtidos no teste de genotipagem de DNAs (Hospital de Câncer de Barretos, 2012/ICESP/INCT-HPV, 2014-2015). 52

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC-H	Células glandulares atípicas de significado indeterminado, mas não se afasta lesão de alto grau
AGC-US	Células glandulares atípicas de significado indeterminado
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i> endocervical
ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, mas não se afasta lesão de alto grau
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
AUC	Área sob a curva ROC
CC	Câncer Cervical
CEC	Carcinoma espinocelular
D(-)	Livre de doença
D(+)	Positivo para doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Região precoce do vírus HPV (“ <i>early</i> ”) - E1, E2, E4, E5, E6 e E7
GS	<i>Gold Standard</i> (Padrão-ouro)
HC2	Captura Híbrida II
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> (Vírus do Papiloma Humano)
hr-HPV	HPV de alto risco
HSIL	Lesão escamosa intraepitelial de alto grau
IC	Intervalo de confiança
L	Região tardia do vírus HPV (“ <i>late</i> ”) – L1, L2
LBC	Citologia em base líquida
LCR	Região longa de controle
LSIL	Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau
MS	Ministério da Saúde
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical (grau 1, 2 e 3)
NILM	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade

OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RLU	Unidade relativa de luz
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
SD	Desvio-padrão
SISCOLO	Sistema de Informação do Câncer de Colo do Útero
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
>	Maior
<	Menor
(+)	Positivo
(-)	Negativo

RESUMO

Lorenzi, AT. *careHPV™ - teste de captura híbrida em unidade móvel para melhoria do programa de rastreamento do câncer cervical em áreas rurais e remotas brasileiras*. Tese (Doutorado). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2015.

JUSTIFICATIVA. O câncer cervical (CC) continua a ser um importante problema na saúde pública nos países em desenvolvimento que não possuem um sistema de rastreamento adequado. Cerca de 85% dos casos e mais de 50% das mortes por CC ocorrem nos países em desenvolvimento. Grande parte das regiões brasileiras tem altos índices de mortalidade por CC, colocando-o como o segundo tipo de câncer mais frequente entre mulheres brasileiras. O Brasil possui áreas rurais e remotas com importantes deficiências na assistência médica. Os programas de rastreamento do CC visam melhorar a identificação das lesões precursoras deste câncer. A associação entre um teste molecular para detecção *Papillomavirus* humano e citologia em base líquida em um dos programas de rastreamento foi proposta com intuito de melhorar a estratégia de proteção da mulher contra o CC. A sensibilidade do teste de HPV DNA parece fundamental para a mulher com limitado acesso ao rastreamento. A infecção persistente por HPV de alto risco (hr-HPV) é condição essencial da carcinogênese cervical. Por isso, a detecção do hr-HPV é importante na identificação destas mulheres em idade de risco de desenvolver lesões. **OBJETIVOS.** Avaliar uma nova metodologia de suporte para o programa de rastreamento do câncer cervical em mulheres de várias regiões do Brasil, utilizando o teste molecular (*careHPV™ - Qiagen, Gaithersburg, MD, USA*) em amostras cérvico-vaginais coletadas por profissional de saúde e/ou por auto coleta, além de comparar os resultados cito-patológicos, com a presença de HPV de alto risco. **MÉTODOS.** No total, 5.079 mulheres com idade entre 18-85 anos participaram de um programa de rastreamento oportunístico para prevenção do câncer cervical, desenvolvido pelo Hospital de Câncer de Barretos no período de Março a Novembro de 2012. Vinte e sete destas mulheres foram excluídas das análises por apresentarem histerectomia. As amostras foram obtidas em duas unidades de coleta: fixa e móveis. Na primeira, as amostras foram randomizadas entre coletas realizadas por profissional de saúde ou por auto coleta. Nas unidades móveis, foram feitas apenas as coletas realizadas pelo profissional de saúde. O teste *careHPV™* foi executado em todas as

amostras obtidas. Todas as mulheres participantes tiveram o teste de Papanicolaou realizado em base-líquida. Foi aplicado questionário sociodemográfico para avaliar as principais características da população participante. As mulheres que apresentaram citologia ASC/AGC-H+ (células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado, porém não se pode excluir lesão de alto grau) e/ou teste molecular positivo, foram convocadas para *follow-up* e exame colposcópico. As amostras positivas foram genotipadas por tecnologia *Luminex* (*Luminex Corporation, TX, USA*). **RESULTADOS.** O teste molecular detectou infecção por hr-HPV em 10,6% (536/5068) das mulheres. As mulheres examinadas na unidade fixa apresentaram frequências de HPV similares entre as amostras auto coletadas e àquelas realizadas pelo profissional de saúde: 13,0% (129/993) e 10,1% (100/989), respectivamente. Nas unidades móveis, a prevalência de hr-HPV foi de 10,0% (307/3.068). A maioria das amostras positivas no teste molecular (79,7%) foi classificada citologicamente como amostras sem alterações malignas (NILM): 81,7% na unidade fixa e 78,2% nas unidades móveis. Ao considerarmos o total de amostras classificadas com lesões de baixo (LSIL) e alto grau (HSIL) pela citologia, 66,2% (47/71) e 90% (18/20) delas foram positivas para hr-HPV, respectivamente. Estes resultados representam 78,8% (26/33) e 55,3% (21/38) para LSIL e 60,0% (3/5) e 100,0% (15/15) para HSIL, entre as unidades fixa e móvel, respectivamente. De acordo com o critério de avaliação estabelecido, foram convocadas 578 mulheres; porém, 46,9% (271/578) delas compareceram para realização da colposcopia, e destas 53,5% (145/271) foram biopsiadas. Um dos casos de biópsia teve resultado insatisfatório. Dentre as mulheres com biópsia satisfatória, 11,1% (14/144) das mulheres hr-HPV positivas foram diagnosticadas como NIC3+, incluindo quatro casos de carcinoma escamoso invasivo. Foi encontrada infecção múltipla em 87,6%, 81,25% e 67,4% das amostras obtidas na unidade fixa: auto coleta e coleta profissional, e móvel, respectivamente. **CONCLUSÕES.** O teste molecular *careHPV™* apresentou boa performance para detecção de HPV na população estudada e, demonstrou ser uma ferramenta alternativa para o rastreamento primário do câncer cervical no Brasil. A auto coleta mostrou ser uma opção importante quando comparada à coleta por profissional de saúde. Os genótipos mais frequentes nas amostras analisadas foram: HPV-56, HPV-51, HPV-53, HPV-18, HPV-58, HPV-52 E HPV-16.

Palavras chave: Autoexame; Câncer de Colo do Útero; Genótipo; Prevenção de Câncer de Colo Uterino; Testes de DNA para *Papilomavirus* humano; Rastreamento.

ABSTRACT

Lorenzi, AT. *careHPV™ - Hybrid capture test in mobile unit can improve the cervical cancer screening program in Brazilian rural and remote areas. Thesis (PhD)*. Barretos: Hospital de Cancer de Barretos; 2015.

BACKGROUND. Cervical cancer (CC) is a noted disease worldwide and remains a critical public health issue in developing countries that lack appropriate screening programs. Persistent hr-HPV infection is the single main risk factor for the development of premalignant and malignant cervical lesions. About 85% of cases and more than 50% of CC deaths occur in developing countries. Most Brazilian regions have dramatic indexes of mortality, ranking the CC as the second most common cancer among Brazilian women. CC screening programs are tailored to optimize the identification of precursor lesions of cervical cancer. A combination of HPV testing with liquid-based cytology screening has been demonstrated to improve the algorithm to protect women against CC. The sensitivity of HPV DNA testing is fundamental for women with limited access to traditional screening. High-risk human *Papillomavirus* (hr-HPV) persistence is the primary cause of cervical neoplasia. Early detection of hr-HPV is important for identifying women at risk for developing cervical lesions. Here, a new methodology to support a cervical cancer screening-program was evaluated in women from Brazilian regions. **OBJECTIVE.** Compare the results from *careHPV™* test in two different units of collection with those obtained through cytology-based analysis, as well the hr-HPV positive samples genotyping. **METHODS.** A total of 5,079 women aged 18–85 years were enrolled in an opportunistic CC screening programme developed by the Barretos Cancer Hospital from March to November 2012. However, twenty-seven hysterectomy women were excluded. The samples were obtained in two different collection units: fixed and mobile, where the first one, the samples were randomized into self-vaginal or health professional-guided cervical sampling groups. The mobile unit was applied just health professional-guided cervical sampling. Qiagen *careHPV™* test was performed on all samples. Pap tests using liquid-based cytology were performed on all women. It was applied a social demographic questioner to evaluate the main characteristics of population studied. All hr-HPV positive samples were tested by Luminex technology (Luminex Corporation, TX,

USA). **RESULTS.** Positive hr-HPV results were obtained in 10,6% (536/5,068) of women. Separately, the fixed unit presented similar rates between self-sampled and health professional-collected samples: 13.0% (129/993) vs. 10.1% (100/989), respectively. In mobile units, the hr-HPV prevalence was 10.0% (307/3,068). Approximately 79,7% (427/536) of the women who showed hr-HPV positive were classified as exhibiting normal cytology (NILM), divided in 81.7% (187) and 78.2% (240) between fixed and mobile units, respectively. Considering the cytology as low-risk (LSIL) and high-risk (HSIL) lesions, 66.2% (47/71) and 90% (18/20) were hr-HPV positive, respectively. These results represent 78.8% and 55.3% to LSIL and 60.0% and 100.0% to HSIL, between fix and mobile units, respectively. According to the criteria established previously, 578 women were referred to follow-up and colposcopy examination; 46.9% (271/578) attended to the colposcopy examination, and 53.5% (145/271) of these women, were biopsied. Just one of them had unsatisfactory biopsy. Among the women with biopsy, 11.1% (14/144) of the hr-HPV positive were diagnosed with CIN3+, including four cases of invasive carcinoma. It was observed multiple infection in 87.6%, 81.25% and 67.4% of the samples obtained in fixed unit: self-sampling and professional sampled, and mobile unit, respectively. **CONCLUSIONS.** The HPV DNA testing showed significant performance to detect HPV in this population and demonstrated to be a feasible alternative to primary cervical cancer screening in the Brazil. Self-sampling can be considered as an option to collect the cervical samples when compared with those obtained by the health professional. The genotypes most frequent were: HPV-56, HPV-51, HPV-53, HPV-18, HPV-58, HPV-52 and HPV-16.

Keywords: Cervical Cancer; Cervix Neoplasms Prevention; Genotype; Human *Papillomavirus* DNA Tests; Self-examination; Screening.

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical (CC) ainda é considerado um dos principais problemas de saúde pública para mulheres que vivem em países em desenvolvimento, representando a quarta neoplasia mais comum na população feminina mundial e a segunda no Brasil^{1, 2}. A infecção pelo *Papillomavirus* humano de alto risco (hr-HPV) tem sido associada diretamente às neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC2+) e a progressão destas lesões ao câncer cervical invasivo³⁻⁶. Testes moleculares têm sido desenvolvidos (DNA ou RNA) para identificar HPV de alto risco devido à associação da infecção persistente do vírus e o desenvolvimento do câncer, principalmente porque estes testes são confiáveis, reprodutíveis e de fácil implementação quando comparados à citologia⁷⁻¹². O uso do teste molecular para detecção de HPV tem estado cada vez mais presente nas rotinas de prevenção de câncer do colo uterino. Quando comparado com citologia convencional ou de base-líquida, a associação com o teste molecular tem demonstrado um aumento na sensibilidade para detectar lesões intraepiteliais em torno de 20-45%^{7-11, 13, 14}. Entretanto, atualmente, fala-se sobre a utilização do teste molecular como alternativa de rastreio primário, sozinho, não mais associado, uma vez que tem demonstrado um aumento da sensibilidade na detecção de lesões NIC2+ e NIC3+ quando comparado à citologia, ou associado a ela¹⁵. A caracterização da infecção pelo HPV de alto risco é importante para determinar a real importância do vírus em uma população específica, suportando estratégias apropriadas para introduzir e manter os programas de prevenção do câncer cervical¹⁶⁻¹⁸. Um novo teste de HPV-DNA (careHPV™ - Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) aprovado pelo FDA (*Food and Drugs Agency*) foi desenvolvido para regiões de limitada infraestrutura; esse teste é uma versão simplificada do bem conhecido teste de Captura Híbrida (HC2). Este novo teste consiste na hibridização de ácidos nucleicos *in vitro* para detecção qualitativa de 14 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66,68) em amostras cervicais^{12, 19, 20}. Diferentes estudos têm demonstrado que o careHPV™ tem uma sensibilidade e especificidade significativas para detectar lesões pré-cancerosas e câncer^{19, 21-24}. A população feminina de diversas regiões do Brasil tem dificuldade de acesso à assistência de saúde pública e muitas vezes, essa dificuldade ocorre devido às longas

distâncias entre a residência das mulheres e o atendimento médico. Baseado neste contexto, desde 1994, o Hospital de Câncer de Barretos introduziu unidades móveis dedicadas ao atendimento da população moradora em áreas rurais e remotas, incluindo Centro-Oeste, Sudeste e Norte do país (região Amazônica), representando uma parte significativa das taxas de lesões associadas ao HPV no Brasil, com o intuito de levar às populações desassistidas um atendimento de qualidade sem a necessidade de percorrerem longas distâncias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer cervical ou câncer do colo de útero

O câncer cervical (CC) é a segunda malignidade mais comum entre mulheres brasileiras, e a quarta no mundo, exceto os casos de câncer de pele não melanoma. Mais de 290 milhões de mulheres são portadoras do HPV no mundo, e cerca de 32% dessas mulheres são infectadas por HPV tipos 16 ou 18, ou ambos, considerados os mais prevalentes nas lesões malignas do colo uterino. Em 2012, foi estimado mais de 528 mil novos casos e 266 mil mortes mundialmente. Mais de 85% dos casos e 87% do total de mortes ocorreram em países pobres ou em desenvolvimento, principalmente devido ao acesso precário à assistência médica para detectar precocemente a infecção e tratá-las de forma adequada^{1-3, 25}.

As principais áreas mundiais de alto risco são¹: África Oriental (42,7 por 100 mil), Melanésia (33,3 por 100 mil), África do Sul (31,5 por 100 mil) e África Central (30,6 por 100 mil) (Figura 1). No Brasil, os dados estimados para 2012 foram cerca de 24.500 casos anualmente, com mais de 11.000 mortes (Figura 2), com risco estimado de 17 casos por 100 mil mulheres^{1-3, 25}.

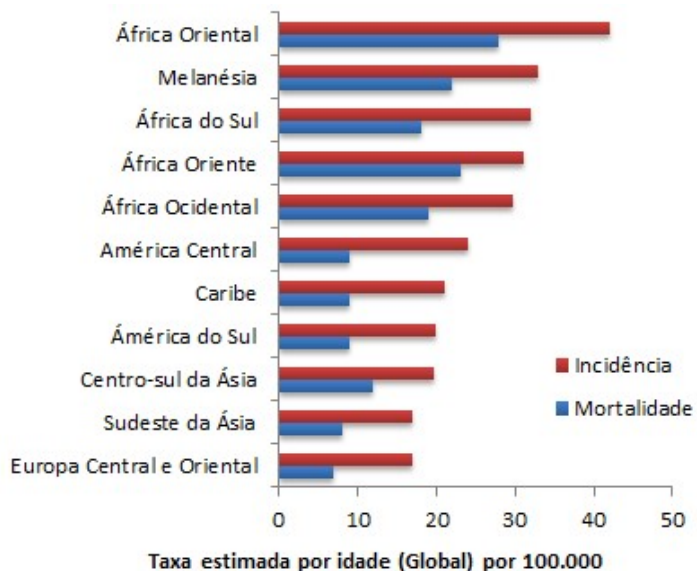


Figura 1 – Incidência e mortalidade do câncer cervical na população mundial. (Fonte: adaptada de Globocan, 2012¹).

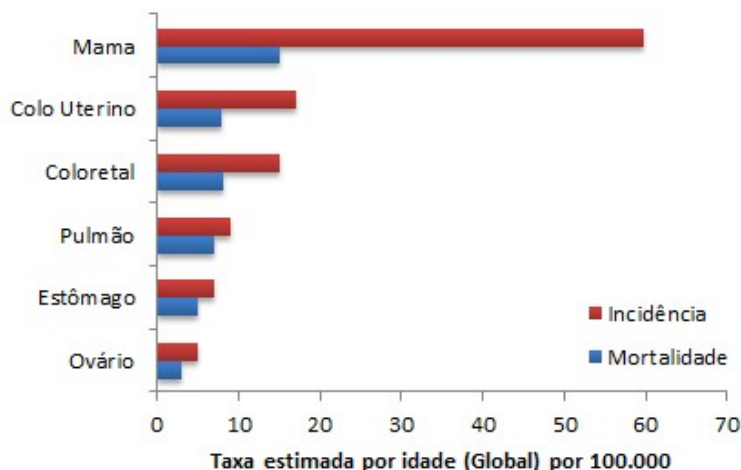


Figura 2 – Incidência e mortalidade do câncer cervical na população brasileira. (Fonte: adaptada de Globocan, 2012¹).

2.2 Lesões Precursoras

O *Papillomavirus* humano possui maior afinidade por tecidos epiteliais cutâneos e mucocutâneos^{26, 27} e, no caso do câncer de colo uterino, infecta preferencialmente a zona de transição entre a junção das células epiteliais glandulares da endocérvice e as células epiteliais escamosas estratificadas da ectocérvice. E dessa forma, afeta a estrutura do epitélio com as células infectadas, que são consideradas responsáveis pelo desenvolvimento do carcinoma cervical associado à infecção por HPV²⁸⁻³¹.

O câncer cervical pode ser classificado histologicamente em dois principais tipos: carcinoma de células escamosas – o mais comum, ocorre em 80% dos casos – e adenocarcinoma, o segundo mais comum entre os casos de câncer cervical. O carcinoma escamoso é resultado da evolução de lesões precursoras, chamadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), que são classificadas de acordo com o grau de alterações morfológicas provocadas, e frequentemente dependente do tempo da persistência da infecção pelo HPV de alto risco e do tempo de evolução dessas lesões até o carcinoma invasivo propriamente dito^{32, 33}. A classificação das neoplasias intraepiteliais mencionadas é:

- NIC 1 – displasia leve, hoje considerada uma lesão de baixo grau (LSIL)
- NIC 2 – displasia moderada, hoje considerada lesão de alto grau (HSIL)

- NIC 3 – displasia grave ao carcinoma *in situ*, hoje considerada lesão de alto grau (HSIL)

As alterações podem ser identificadas por exame microscópio do material coletado no exame de Papanicolaou (esfregaço ou raspado celular). De acordo com o sistema Bethesda de 2001 e 2014^{34, 35}, as alterações histológicas são classificadas em:

- NILM – negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna;
- ASC/AGC-US – células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado;
- ASC/AGC-H – células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado, porém não se pode excluir lesão de alto grau;
- LSIL – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
- HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
- Carcinoma escamoso
- AIS - Adenocarcinoma *in situ* endocervical
- Adenocarcinoma

2.2.1 Fatores de risco

Sabe-se que a infecção por HPV está diretamente associada ao desenvolvimento do câncer cervical. No entanto, é necessário levar em consideração que alguns cofatores externos podem também estar relacionados ao processo carcinogênico, tais como idade, hábito de fumar, uso de anticoncepcional oral por longo período, elevado número de gestações e múltiplos parceiros sexuais^{32, 36-38}:

i. Paridade

O número elevado de gestações é considerado um fator associado ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical invasivo. Risco este que pode ter seus mecanismos relacionados às lesões da ectocérvice por diversos anos, facilitando a exposição ao HPV, além dos fatores hormonais envolvidos.

ii. Tabaco

O desenvolvimento de lesões de alto grau associadas ao HPV de alto risco, também pode estar relacionado com o hábito de fumar, que pode elevar o risco para o carcinoma cervical, mas não o adenocarcinoma quando comparados àqueles que não possuem o hábito de fumar. O provável mecanismo associado é a redução da imunoresposta no colo uterino, que também está envolvido com o metabolismo hormonal feminino e danos genéticos na carcinogênese associados ao tabaco.

iii. Anticoncepcional Oral

O uso contínuo de contraceptivo oral pode também estar relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer cervical. O principal mecanismo envolvido é a ação dos estrógenos e progesteronas que elevam a expressão dos genes do HPV no cérvix, utilizando os receptores de progesterona, e então os elementos de resposta hormonal.

iv. Número de Parceiros Sexuais

O elevado número de parceiros sexuais está associado ao aumento da exposição às doenças sexualmente transmissíveis, e conseqüentemente aumentando a chance de persistência de infecção pelo *Papillomavirus* humano, bem como ao aumento da carga viral nas lesões do colo uterino.

2.3 *Papillomavirus* humano (HPV)

O *Papillomavirus* humano (HPV) é um pequeno DNA-vírus, não envelopado, com fita dupla circular, com mais de 8 mil pares de base em seu genoma^{26, 27}. Desde os anos 70, associa-se a infecção específica por HPV ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. Atualmente, mais de 200 genótipos de HPV têm sido identificados, e cerca de 40 tipos são passíveis de infectar os tratos oro-genital humano e provocar manifestações clínicas (proliferações benignas) como as verrugas (papiloma); neoplasias intraepitelial anal, oro e esofágea-faríngea, além do câncer cervical invasivo, que apresenta elevada morbidade e mortalidade^{27, 38-41}. Muitos tipos de HPV promovem doenças epiteliais (assintomáticas ou infecções transientes) e estão associados a diferentes estratégias de transmissão e

propagação dentro do epitélio e interação com o sistema imune⁴. Considerando o câncer cervical, o HPV é fator essencial, embora não suficiente, para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino, envolvido em 99,7% dos casos. O processo de desenvolvimento da doença precisa da persistência viral, progressão do epitélio infectado, promoção de lesões pré-cancerosas e cancerosas, culminando com a invasão da membrana basal^{42, 43}.

2.3.1 Classificação

Os tipos de HPV genitais são subdivididos em grupos de alto e baixo risco, dependendo das evidências epidemiológicas e do desenvolvimento do câncer. Os tipos mais comuns no grupo de alto risco (oncogênicos) são: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59; enquanto que no grupo de baixo risco (não oncogênicos) encontramos os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. Ao considerarmos o grupo de alto risco, quando ocorre a desregulação da expressão do gene viral, a infecção pode acometer diferentes locais, afetando pênis (homens), vagina, colo uterino e vulva (mulheres), zona anal, língua, orofaringe e a base da língua em ambos os sexos^{4, 28, 41, 44}.

2.3.2 O ciclo do *Papillomavirus humano*

O ciclo do HPV é considerado completo ou não dependendo do local da infecção e alguns fatores externos (por exemplo, hormônios e citocinas)⁴. Em geral, seu ciclo de vida (Figura 3) possui três fases de replicação: infecção, divisão e amplificação. Primeiro o vírion infecta os queratinócitos basais e o genoma viral produz um pequeno número de cópias nas células infectadas. A segunda fase envolve a replicação do genoma viral no DNA do hospedeiro, onde as células são divididas em células-filhas. Essas células podem persistir na camada basal e seguir com a divisão ou podem mover e iniciar um processo de diferenciação, ativando a expressão de genes tardios e o início da amplificação do DNA viral vegetativo (terceira fase). Essa amplificação sintetiza um grande número de cópias do genoma viral. Assim, as células infectadas fornecem um reservatório infectado que irá reabastecer o epitélio^{4, 45, 46}.

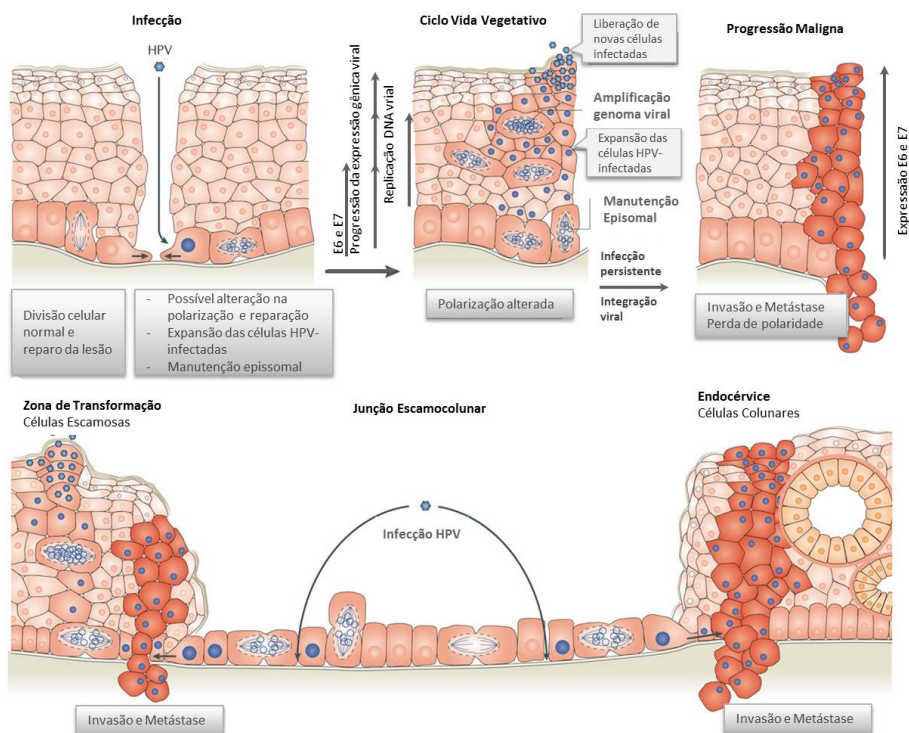


Figura 3 – Ciclo celular: progressão da infecção por HPV. (Fonte: Banks et al, 2012⁴⁷).

2.4 Carcinogênese

Apesar de ainda muito se pesquisar sobre o câncer cervical, este é o tipo de câncer mais completamente compreendido e com um modelo de carcinogênese bem definido (Figura 4)⁴⁸.

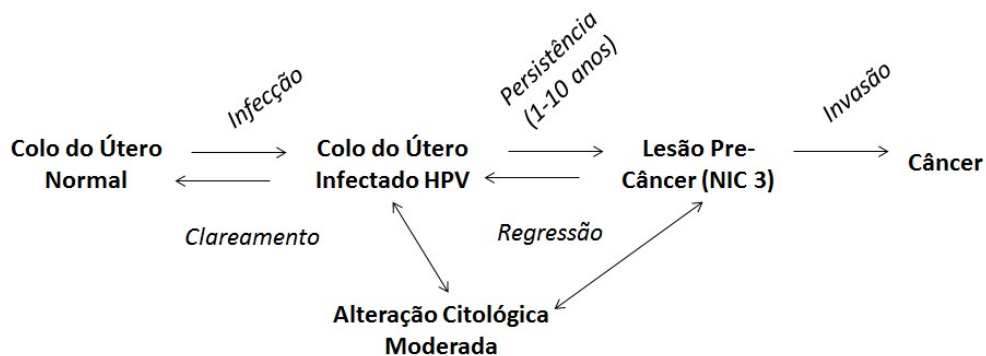


Figura 4 – Ilustração da carcinogênese da infecção por HPV. (Fonte: modificado de Moscicki et al, 2006⁴⁹).

2.4.1 Aquisição

A infecção por HPV é facilmente transmitida por relação sexual; sua prevalência é alta quando o indivíduo inicia a atividade sexual – maior exposição ao vírus – e há baixa imunidade⁵⁰⁻⁵². Entretanto, há estudos que mostram que recém-nascidos de mães HPV positivas apresentam 33% mais risco de adquirir a infecção por HPV, quando comparados aos filhos de mulheres negativas para infecção⁵³. A neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e o câncer cervical têm sido associados diretamente à infecção persistente por HPV – considerado, como já antecipado, causa necessária para essas lesões⁵⁴. A maioria dos homens e mulheres sexualmente ativos será infectada pelo HPV ao menos uma vez na vida. O câncer cervical ocorre como resultado de uma infecção persistente pelo vírus HPV.

2.4.2 Clearance

Em geral, a maioria das infecções (90%) clareia espontaneamente, sem sintomas clínicos, por meio de resposta imune e não persiste tempo suficiente para desregular a expressão gênica e acumular falhas genéticas nas células infectadas. Os indivíduos que desenvolvem lesões benignas podem regredir com a resposta imune. Cerca de 50% das novas infecções não são detectadas antes de 6 a 12 meses, e a maioria delas clareia em até dois anos. Outra hipótese defendida sobre a regressão da lesão é que o genoma viral permanece latente e pode ser reativado com supressão imunológica ou alterações de níveis hormonais^{4, 28, 43, 49, 51, 52, 55}.

2.4.3 Persistência

Cerca de 10% das infecções por HPV podem se tornar persistentes. Nestes casos, lesões não tratadas tem uma grande chance de evolução para o câncer em alguns anos^{4, 49, 51}. Os *Papillomavirus* promotores dessas lesões são regulados por proteínas virais e acabam por influenciar a divisão irregular das células infectadas^{28, 29}. Uma vez instalada a infecção, o genoma viral estabiliza os elementos extracromossomais (epissomas) no núcleo, e a carga viral é aumentada de 50 a 100 cópias por célula, mantendo o processo de infecção. O genoma do HPV (Figura 5) possui genes regulatórios que codificam seis proteínas de

expressão precoce (E1, E2, E4, E5, E6, E7) e genes estruturais que codificam duas proteínas de expressão tardia (L1, L2)^{41, 56, 57}.

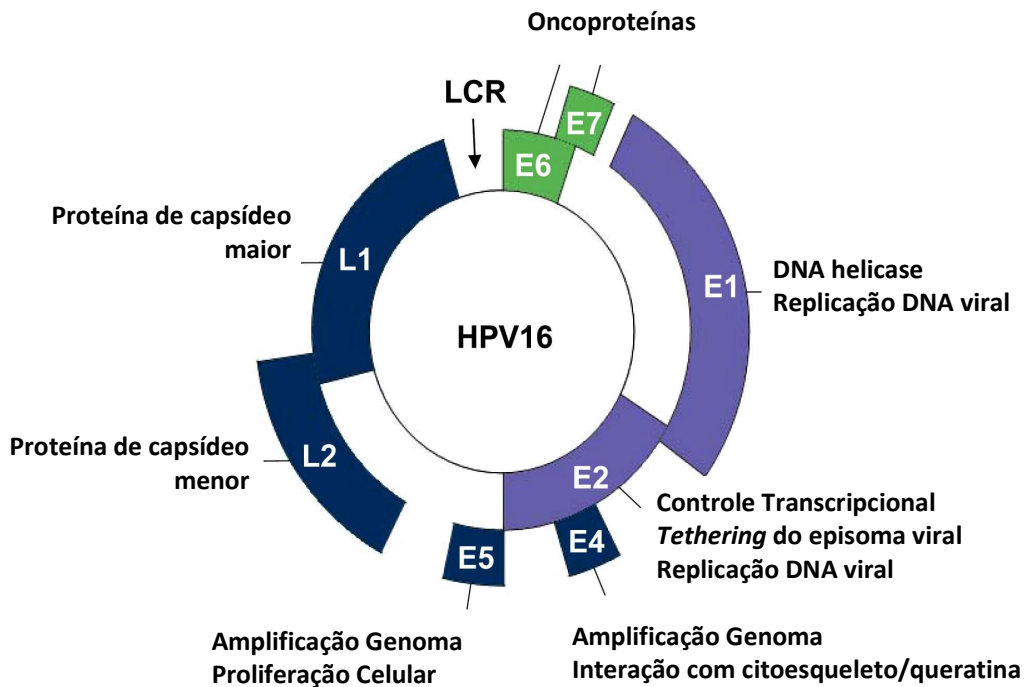


Figura 5 – Organização do genoma do HPV. Representação esquemática adaptada do genoma circular do HPV16, ilustrando a localização das regiões precoces (E) e as tardias (L1 e L2), e a região longa de controle (LCR)⁵⁸.

As proteínas E1 e E2 são responsáveis pelo ciclo infeccioso do HPV: são as primeiras a serem expressas e funcionam como um indicador do número de genoma viral presente na célula. E2 é uma proteína de ligação necessária para iniciar a replicação do DNA viral e recrutar a helicase E1 (de origem viral), que associadas a certas proteínas celulares (proteína de replicação e DNA polimerase) iniciam a replicação do DNA. Além das proteínas E1 e E2, acredita-se que as proteínas E4 e E5, através da alteração do ambiente celular, contribuem indiretamente para o sucesso da amplificação do genoma viral. O bloqueio do ciclo celular na infecção por HPV de alto risco é mediada pelas proteínas virais E6 e E7 através da degradação do p53 e a inibição do pRb (Retinoblastoma), respectivamente, desencadeando a proliferação celular^{4, 39, 40}. As proteínas E6 e E7 são reprimidas por E2, e a integração viral

ocorre devido ao descontrolo transcripcional promovido por E2 e resulta na expressão aumentada de E6 e E7, promovendo a imortalização e a transformação das células infectadas ^{4, 29, 40, 55}.

O principal papel das proteínas E6 e E7 é promover o ciclo celular para reentrar na camada epitelial e permitir a amplificação do genoma. Desse modo, a célula infectada reentra na fase S e aumenta o número de cópias do genoma viral. A replicação das proteínas virais E1 e E2 é essencial para ampliar significativamente a hiperregulação do HPV na fase inicial da amplificação; entretanto, depois de estabelecido o número de cópias virais, pode ser dispensável para a manutenção da replicação episomal. A amplificação do genoma está associada às proteínas E4 e E5 ⁴.

No processo de divisão das células infectadas, um reservatório de DNA viral é formado por células da camada basal, que então distribuem o DNA viral para as células filhas, que são elevadas em direção à superfície epitelial, capazes de persistir por anos na camada basal ^{4, 40}.

Setenta por cento dos casos de câncer cervical são associados aos HPV tipos 16 e 18. As verrugas genitais são predominantemente relacionadas aos tipos 6 e 11. O HPV 16 é mais persistente que outros tipos e pode ter uma maior contribuição para o risco de câncer. O HPV 18 está mais associado aos adenocarcinomas. Atualmente, sugere-se que os HPV 16, 18 e 45 são diretamente relacionados aos adenocarcinomas e pode infectar células potencialmente diferenciadas ^{4, 59}.

Acredita-se que 40% das infecções por HPV são mistas. Por esta razão, a identificação precisa dos genótipos de HPV de alto risco em infecções mistas é essencial para definir o risco da mulher para o desenvolvimento do câncer cervical e, apesar da maioria das infecções por HPV desaparecem espontaneamente, a infecção persistente com tipos de HPV oncogênicos é um importante fator de risco para o câncer cervical⁶⁰.

2.5 Incidência do Câncer Cervical

A infecção por HPV é mais comum entre mulheres com idade abaixo de 25 anos, enquanto que o pico da prevalência da infecção por HPV ocorre em mulheres acima dos 45 anos. Acredita-se que esse pico deva ser ocasionado em função das alterações hormonais e mudança de comportamento sexual (relações extraconjugais, por exemplo). A maioria das

lesões pré-malignas e malignas são do tipo escamosas e os HPV tipos 16 e 18 são predominantes^{50,61}.

Estima-se que o rastreamento populacional sistemático, e o tratamento de lesões precursoras possam reduzir, em média, de 60 a 90% a incidência do câncer cervical invasivo². A progressão do câncer cervical é lenta, pode levar anos ou décadas entre a lesão inicial e invasiva. No entanto, essa evolução lenta representa uma oportunidade de detectar as lesões mais precocemente e promover ações preventivas eficientes na tentativa de modificar o quadro evolutivo da doença^{1, 2, 48, 50}.

O reconhecimento de que a infecção pelo HPV é uma causa necessária de câncer cervical, incluindo a prevenção primária com vacinas altamente eficazes, e a secundária, com testes altamente sensíveis de detecção de DNA-HPV, melhorou significativamente o desempenho dos programas de rastreio com base no teste de Papanicolaou⁶². Os programas de prevenção atuantes no país devem garantir o acesso ao exame preventivo de qualidade às mulheres com idade entre 25 e 64 anos. No entanto, atualmente no Brasil, não há um programa de rastreio organizado, e dessa forma não há como controlar a periodicidade e as mulheres que realizam os exames de rotina⁶³.

2.5.1 Vacinação contra HPV

Embora a vacinação global de adolescentes e mulheres jovens seja um procedimento vantajoso, os custos e estratégias de saúde pública para alcançar este objetivo ainda representam problemas importantes a serem superados. Os estudos de custo e eficácia relacionados à redução da incidência do câncer de colo do útero devem envolver o rastreio e a vacinação em abordagens integradas e organizadas que tirem proveito dos testes de HPV como triagem primária, seguidos de triagem com citologia de Papanicolaou. Um recente estudo realizado no México apresentou uma elevada melhora na prevenção do câncer cervical com uso do teste HPV em um programa governamental⁶⁴. Isto é significativo porque o teste de Papanicolaou possui algumas limitações importantes, como a interpretação subjetiva das alterações morfológicas; adicionalmente, as amostras de colo do útero devem ser colhidas com a devida atenção à amostragem de células da zona de transformação; há também que se considerar a natureza altamente monótona da avaliação citológica no trabalho de rastreio, o que leva a fadiga e invariavelmente provoca erros de interpretação⁶⁵.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, os HPV tipos 16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical no mundo. E as vacinas disponíveis contra a infecção por HPV 16 e 18 têm o potencial de reduzir a incidência de outros cânceres cervical e anogenital. O Brasil tem uma população de 69,14 milhões de mulheres com idades entre 15 anos ou mais que estão em risco de desenvolver câncer cervical e que poderiam se beneficiar da vacina ²⁵.

Atualmente, é assumido que a vacinação contra o HPV⁶⁶ poderá reduzir substancialmente a prevalência de lesões relacionadas com o HPV, e aumentar significativamente as elevadas taxas de resultados falsos negativos da citologia, além de potencialmente diminuir a especificidade ⁶². A combinação da vacinação de HPV e testes de HPV com a triagem citológica é sugerida como o melhor algoritmo para proteger as mulheres do carcinoma cérvico-vaginal ^{62,67}.

Em 2014, o Sistema Nacional de Saúde (SUS) incluiu a vacina quadrivalente contra HPV (tipos 6, 11, 16 e 18) no calendário de vacinação. Inicialmente, oferecida às garotas entre 11 e 13 anos, estendendo-se para 9 a 13 anos a partir de 2015⁶⁸. A vacinação contra o HPV deve ser considerada um método profilático na prevenção do câncer cervical, especialmente ao considerar adolescentes antes de iniciarem atividades sexuais⁵.

2.6 Prevenção do Câncer Cervical

O papel mais importante dos programas de rastreio é prevenir o desenvolvimento de lesões HPV-associadas, pois o índice de mortalidade ainda é elevado entre mulheres sem ou com procedimentos inadequados no rastreio cervical ^{1, 69}. A prevenção do câncer de colo uterino vem obtendo grandes avanços devido às extensas pesquisas tecnológicas, relacionadas ao desenvolvimento de testes moleculares para identificação precoce das mulheres com lesões pré-cancerosas HPV-induzidas⁴⁸. O principal objetivo de rastreio do câncer é reduzir a mortalidade desta doença. No rastreio cervical, a redução da incidência da doença invasiva é também um dos objetivos além das lesões pré-cancerosas que são eficientemente tratáveis ^{7, 28, 70}.

2.6.1 *Screening* Citológico

i. Teste de Papanicolaou

O início dos anos 50 foi um marco na área de prevenção do câncer de colo uterino. Foi quando se iniciou o rastreio com o teste de Papanicolaou (raspado ou esfregaço celular). Algumas décadas depois, o pesquisado Harald zur Hausen identificou o Papillomavirus humano nos casos de câncer cervical. Depois disso, nos anos 90 foi estabelecido que o vírus era sexualmente transmitido e alguns HPV carcinogênicos foram identificados e associados diretamente ao desenvolvimento do câncer cervical⁷¹. O ano de 1999 foi marcado pelo surgimento da citologia em base líquida (LBC). O material coletado é inserido em um frasco contendo um meio líquido preservativo que, por sua vez, viabilizou a redução da ocorrência de sobreposição de células no momento do preparo da lâmina para leitura automatizada, fato este que ocorre em grande parte dos esfregaços manuais sobre lâmina de vidro, dificultando a leitura. A LBC é utilizada pelo Hospital de Câncer de Barretos (HCB) já há alguns anos. O advento da citologia em base líquida proporcionou uma significativa melhora na qualidade da amostra, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade do teste citológico. A grande melhoria oferecida pela citologia em base líquida, além da redução significativa de amostras inadequadas, é a possibilidade de adicionar testes moleculares em combinação com a citologia na mesma amostra. Esta é uma vantagem notável, porque os meios líquidos tendem a preservar o DNA e RNA (além de proteínas), que poderão ser testados por diferentes ensaios moleculares^{72,73, 74}.

Os métodos de citologia cervical, seja convencional ou em base líquida, têm sido considerados padrões nos programas de rastreio do câncer cervical para detecção de lesões pré-cancerosas e do câncer de células escamosas invasivas em mulheres assintomáticas, em muitos países, incluindo-se o Brasil. Ambos os testes têm sido implementados na prevenção secundária do câncer cervical com diferentes graus de sucesso, funcionando de forma impressionantemente bem em países desenvolvidos, mas infelizmente nunca repetiu o mesmo sucesso em países pobres ou em desenvolvimento. A metodologia utilizada para o exame de Papanicolaou também obteve sucesso na identificação de displasias de alto grau, considerada o mais importante precursor do câncer cervical invasivo⁷⁵. No entanto, a

citologia possui limitações na execução, necessita de treinamento e capacitação constantes, além de boa infraestrutura laboratorial, padronização e rígido sistema de controle de qualidade^{16, 50, 70}.

O teste de Papanicolaou convencional possui algumas limitações importantes, como a interpretação subjetiva das alterações morfológicas observadas nas amostras coletadas; além do trabalho repetitivo ao se ler diversas lâminas por dia, podendo levar a erros de interpretação; mas principalmente, ao alto índice de resultados falso-negativos, que resultam em graves implicações clínicas. Deve-se ressaltar que com essas limitações, o número de repetições dos exames ocorre em intervalos menores e com isso há uma disparidade econômica, principalmente em regiões de baixos recursos financeiros. Dessa forma, diversos países em desenvolvimento mantêm as taxas de incidência e mortalidade muito elevadas; enquanto que os países desenvolvidos já obtiveram uma redução significativa destes índices⁷⁵⁻⁷⁷.

O uso da citologia em base líquida tem auxiliado na redução do problema na eficiência do processamento de amostras celulares, incluindo a interpretação subjetiva das alterações morfológicas e a fadiga devido à repetitividade do trabalho. Porém, ainda não provou ser muito mais sensível que o exame convencional em países desenvolvidos, o que leva a uma interpretação enviesada sobre as limitações de desempenho da citologia^{7, 62, 76}.

2.6.2 Screening com teste HPV DNA

Com base no papel da infecção por HPV na causa do câncer cervical, diversas metodologias têm sido desenvolvidas para serem incorporadas nos programas de prevenção do câncer cervical, como a vacinação e os testes de DNA de HPV de alto risco¹⁰. Os testes moleculares têm se mostrado sensíveis e confiáveis, apesar de sua especificidade ser reduzida em relação aos exames de rotina citopatológica. Estudos recentes mostraram que o teste de HPV DNA tem elevada acurácia quando comparado à citologia, e este método pode vir a ser uma ferramenta de escolha para o rastreio, sobretudo para os países em desenvolvimento quanto à saúde da mulher e a prevenção do câncer cervical^{48,78, 79}. Com a associação dos testes moleculares à citologia, estima-se que seja possível reduzir a alta incidência de câncer cervical dentro de 4-5 anos, e a mortalidade em cerca de 8 anos⁴⁸. O

teste HPV DNA negativo oferece uma garantia mais confiável quando comparado a um resultado de citologia negativo. Com esse tipo de teste, é possível rastreamos o grupo de mulheres que realmente necessita de *follow-up* e aquele em que a intervenção não é necessária⁴⁸.

A associação dos testes de HPV DNA como coteste à citologia tem sido aceita no rastreio de mulheres maiores de 30 anos¹⁰. Desta maneira, o teste molecular tem sido proposto para detectar tipos de HPV oncogênicos como uma alternativa do rastreio primário, combinado ou não à citologia^{54, 78}. Atualmente, o uso de testes moleculares é defendido como alternativa primária, e não mais como coteste¹⁵.

O teste HPV DNA pode ser usado em algumas aplicações clínicas para auxiliar na investigação da infecção: triagem (mulher com alteração citológica – baixo grau ou menos); rastreio primário (detecção precoce de lesões precursoras – sozinho ou combinado com o Papanicolaou); *follow-up* adequado (mulheres rastreadas com citologia alterada e colposcopia/biopsia não alteradas); prognóstico (NIC e tratamento); informações sobre a persistência do HPV e investigação regional para observar sua prevalência para desenvolver novas estratégias de impacto global^{22, 50, 59}. Assim, tem-se elevado a taxa de identificação de mulheres infectadas, principalmente em regiões de baixa infraestrutura, quando comparado ao teste de Papanicolaou^{16, 22}. Testes moleculares para identificar HPV permitem detectar infecções associadas ao HPV de alto risco de maneira mais sensível e específica, possibilitando uma melhoria nas taxas de detecção das lesões de alto grau do colo uterino. Em áreas rurais e remotas, a citologia não é uma boa opção pelos motivos mencionados anteriormente; o teste de HPV DNA tem demonstrado consistentemente ser uma excelente opção, quer seja coletado por profissional de saúde ou auto coletado⁸⁰.

i. Auto Coleta (*Self-sampling*)

Ainda nos dias atuais, é comum nos depararmos com mulheres que apresentam uma “barreira emocional” ao passar por um exame ginecológico, seja por vergonha, receio de sentir dor ou desconforto, aspectos relacionados a impedimentos culturais ou religiosos, ou até mesmo pela dificuldade em encontrar um médico em que adquira confiança⁸¹. Considerando este contexto, a auto coleta poderia ser considerado uma alternativa simples

para tentar superar essas barreiras⁴⁸. A auto coleta de amostras vaginais para o teste de HPV pode ser útil também para grupos de mulheres que vivem regiões com baixa infraestrutura e acesso restrito ao sistema de assistência médica, aumentando a aceitabilidade e a efetividade dos programas de rastreamento do câncer cervical, podendo assim, proporcionar uma cobertura populacional mais alargada e efetiva^{82, 48}.

Uma meta-análise realizada recentemente demonstrou uma concordância aceitável na detecção de HPV DNA entre amostras auto coletadas cérvico-vaginais e amostras coletadas por profissional de saúde⁸³. Deve-se ainda considerar a praticidade e a facilidade desse tipo de teste (pode ser coletado em casa) em ser aplicado em regiões remotas; menor desconforto na coleta; e a maior preferência pelas mulheres que realizam auto coleta quando comparada à realizada por profissional de saúde⁷⁸. Além disso, a auto coleta tem um custo menor e é um procedimento menos invasivo. No entanto, o *Gold standard* desse tipo de teste ainda é a coleta realizada por profissional (uso do espécuro)^{78, 83}.

Estudos recentes constataram que apesar do valor preditivo positivo mais baixo do teste HPV DNA nas amostras vaginais auto coletadas em comparação à citologia, eles podem ser melhores na detecção de NIC2+ em locais de baixa renda e infraestrutura restrita, que reduzem a eficácia dos programas de rastreamento baseados em exames citológicos, independentemente da idade das mulheres participantes dos programas. Observa-se que a aceitabilidade da auto coleta é superior quando comparado à coleta realizada pelo médico, tanto em países desenvolvidos como os subdesenvolvidos⁴⁸. Entretanto, ainda nos deparamos com uma menor especificidade desse tipo de teste, que normalmente é menor que a citologia; além da dificuldade dessas mulheres retornarem para continuar o processo de segmento (colposcopia e biópsia)^{82, 84}.

ii. O Teste *careHPV™*

O sistema *careHPV™* (Figura 6) foi desenvolvido pela QIAGEN Corporation, em 2007 e Bill Gates & Melinda Foundation, especialmente para países pobres e em desenvolvimento. É um teste baseado na Captura Híbrida II (HC2, Qiagen) com algumas mudanças: o tempo de análise é menor; o meio de coleta não contém sais tóxicos e é formulado para solubilizar amostras cervicais coletados por escova. O teste demonstrou ser uma opção viável para

identificação de lesões cérvico-vaginais em populações carentes de áreas rurais e remotas, onde há ausência de assistência médica. Sua sensibilidade é menor que a versão tradicional do teste HC2, mas ainda assim oscila em torno de 90%^{12, 72, 85}. Este teste utiliza a hibridização *in vitro* de ácidos nucléicos com a amplificação de sinal para detectar qualitativamente um *pool* de 14 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 69) em amostras cervicais^{22, 85}.

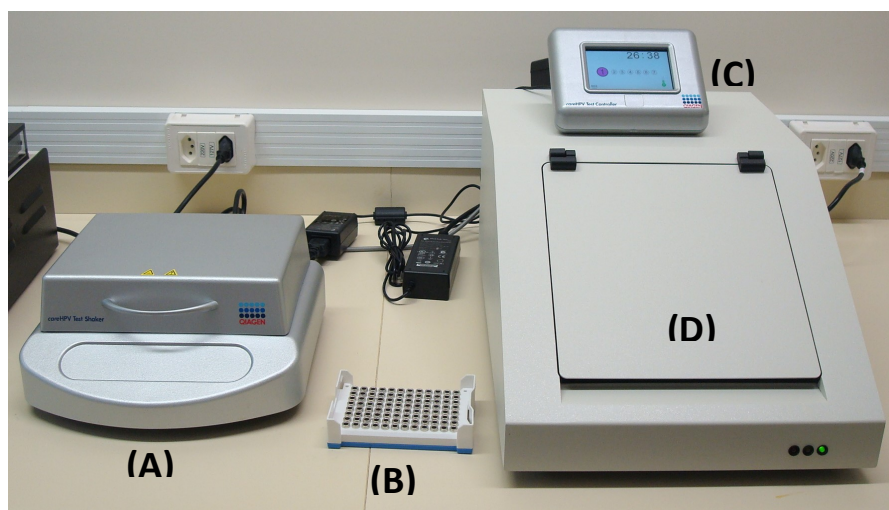


Figura 6 – Equipamento completo *careHPV™*, constituído de um agitador (A), placa magnética (B), controlador (C) e luminômetro (D). (Fonte: arquivo pessoal).

Desde 2007, diversos estudos utilizando o *careHPV™* têm sido documentados em países como China, Ruanda, Nigéria, Nicarágua, Índia e Uganda. Em 2008, um estudo publicado na revista *Lancet Oncology*¹², mostrou que o teste *careHPV™* apresentou alta sensibilidade na detecção de lesões intraepiteliais do colo uterino, de moderada a severa. Em 2012, seu uso foi aprovado para o rastreio primário na Índia e outros países em desenvolvimento^{12, 85}.

O teste *careHPV™*, por ser um teste de fácil execução e não necessitar de complexa infraestrutura é uma poderosa ferramenta para enfrentar os desafios da prevenção de câncer para muitas mulheres de países em desenvolvimento, particularmente aquelas que vivem em áreas onde os cuidados médicos são raros e de difícil acesso. É um teste que pode ser executado por um profissional de saúde com formação mínima de laboratório, podendo ser realizado em qualquer ambiente – inclusive aqueles desprovidos de água canalizada e/ou

energia elétrica (é possível utilizar uma bateria externa). O material cervical pode ser coletado pelo profissional de saúde ou pela própria mulher (auto coleta), uma vantagem importante onde as barreiras culturais desencorajam exames ginecológicos.

Os resultados são interpretados facilmente, e disponibilizados em até 4h (considerando o processo completo, e não apenas as 2h30 das reações propriamente ditas), permitindo que a triagem e o tratamento, se necessário, sejam realizados em uma única visita. A rápida disponibilidade dos resultados permite que mulheres em risco ou com câncer cervical sejam rapidamente identificadas.

Conhecido por ser eficaz em estratégias do tipo "detectar e tratar", essa "visita única" é essencial para o controle remoto, uma vez que estas mulheres dificilmente viajam longas distâncias para receber cuidados de saúde e *follow-up*. Quando combinado com o acompanhamento e tratamento adequados, o teste *careHPV™* pode salvar diversas de mulheres de uma lesão com potencial para evolução ao câncer cervical.

2.6.3 Screening no Brasil

Na década de 70, o Ministério da Saúde (MS) decidiu implementar o Programa Nacional de Controle do Câncer, especialmente ao rastreamento do câncer de colo uterino. Em 1984, na tentativa de oferecer serviços de saúde à mulher, criou-se o Programa de Atenção Integral à Saúde da Mulher (PAISM), que contribuiu com o início de exames preventivos de rotina (Papanicolaou) nas consultas ginecológicas⁶³. Dois anos depois, foi lançado o Programa de Oncologia (PRO-ONCO) com o intuito de encontrar medidas significativas para se conseguir o controle e a prevenção do câncer de colo uterino. Foi então que se determinou a faixa etária e o intervalo de exames necessários para a prevenção do câncer cervical. Em 1988, com a criação do SUS – Sistema Único de Saúde – o Instituto Nacional Contra o Câncer (INCA) absorveu o PRO-ONCO e assumiu a responsabilidade pela política do câncer no país. Em 1996, um projeto-piloto (Viva Mulher) desenvolvido em Curitiba, Recife, Distrito Federal, Rio de Janeiro, Belém e Sergipe colaborou com o desenvolvimento de protocolos de padronização de coleta de material e *follow-up*. Com o sucesso deste projeto, o mesmo foi expandido para todo país. No mesmo ano, 1988, foi criado o SISCOLO – Sistema de Informação do Câncer de Colo do Útero – para monitorar as ações desenvolvidas no

controle do câncer cervical. Já em 2005, voltada para o controle de câncer cervical e mama, foi criada uma Política Nacional de Atenção Oncológica (PNAO) atingindo setores de saúde estaduais e municipais. Entretanto, apesar de todos estes planos e programas, o Brasil ainda apresenta altos índices de incidência e mortalidade do câncer cervical⁶³.

2.6.4 Unidades Móveis do Hospital de Câncer de Barretos

O Hospital de Câncer de Barretos (HCB) iniciou as atividades de unidades móveis em 1994, com uma modesta unidade composta por uma enfermeira utilizando bicicleta e uma "cama ginecológica" portátil. Posteriormente, outros veículos substituíram a bicicleta e a abrangência de trabalho das unidades móveis aumentou.

Atualmente, são dez unidades móveis (Figura 7) utilizadas para realizar mamografias e coletar amostras citológicas para o Teste de Papanicolaou, acomodados em ônibus ou caminhões de grande porte, com ampla complexidade, autonomia e conforto.



Figura 7 – Modelo de unidade móvel utilizada pelo Hospital de Câncer de Barretos. (Fonte: Departamento de Engenharia do Hospital de Câncer de Barretos).

Duas unidades realizam ambos os exames, três dedicam-se apenas ao teste de Papanicolaou e outras cinco servem apenas às mamografias. Essas unidades viajam por diferentes trajetos que incluem áreas remotas das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte, e representam uma fração significativa de mulheres que apresentam lesões induzidas pelo HPV no Brasil. Os Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São

Paulo, Bahia e Rondônia fazem parte da rota das unidades móveis. A prevenção de câncer de colo uterino com o uso dessas unidades compreende um universo de cerca de 26 mil mulheres/ano (base 2012), entre as 400 cidades brasileiras assistidas (nos sete Estados citados). Mulheres com teste citológico anormal (ASC-H+) são rotineiramente recrutadas para exames clínicos (colposcopia e/ou biópsia), no Hospital do Câncer de Barretos ou eventualmente encaminhadas para centros hospitalares próximos às cidades visitadas.

Um dos alvos mais importantes nos estudos de HPV é a melhoria dos programas de rastreio regulares e qualificá-los para detectar precocemente as lesões induzidas por HPV, em mulheres das áreas atendidas pelas unidades móveis, e obter o segmento adequado e tratamento desse grupo. Alguns testes de HPV DNA são úteis e podem ser reproduzíveis em áreas remotas, podendo ser utilizados com desempenho satisfatório para identificação dos HPVs de alto risco.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui uma das regiões mais pobres e carentes em termos de cuidados médicos no mundo. Há inúmeras populações localizadas em regiões localizadas em áreas rurais e remotas do país, com deficiências críticas na assistência médica.

Associando-se a experiência do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII em Prevenção de Câncer e a utilização de unidades móveis na realização dos programas de rastreio, as mulheres destas áreas deficientes poderão ser beneficiadas com a implantação de um programa regular de rastreio qualificado e com potencial de melhoria das taxas de detecção de lesões induzidas pelo HPV, de forma a atendê-las e acompanhá-las (*follow-up*) adequadamente.

O teste molecular *careHPVTM* (*Qiagen Inc., Gaithersburg, MD*), demonstrou ser facilmente reprodutível e útil em áreas remotas, com excelente desempenho, sensibilidade e especificidade para identificar HPV de alto risco. Trata-se de um teste diagnóstico rápido, confiável e de baixo custo, que poderá apoiar uma intervenção médica mais pragmática, juntamente com os exames de colposcopia e biópsia.

Ainda há uma descentralização significativa das ações de saúde no país, que deveriam ser prioridade nos programas de rastreio, na tentativa de melhorar a detecção das lesões pré-malignas de uma população de risco.

A triagem, o diagnóstico e a abordagem terapêutica das mulheres atendidas nas unidades móveis que assistem principalmente as áreas rurais e remotas do Brasil poderão dar a elas, talvez, uma oportunidade única de acesso ao sistema de saúde e assim obter um desfecho que se traduza na redução dos índices de mortalidade por carcinoma de colo uterino.

A idéia central deste estudo foi avaliar a performance do teste molecular *careHPVTM* para ser utilizado como ferramenta de screening primário em algumas regiões do Brasil, principalmente àquelas em que o sistema de saúde é precário; através da utilização das unidades móveis, e discutir criticamente, a potencial utilidade deste método para detectar lesões de alto grau associadas ao Papillomavirus humano.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho diagnóstico do teste *careHPV™* em detectar HPV de alto risco associado às lesões do colo uterino em mulheres de populações de zonas rurais e remotas brasileiras.

4.2 Objetivos Específicos

- i. Comparar as frequências de HPV detectadas pelo teste *careHPV™* em amostras coletadas por profissionais de saúde e por auto coleta;
- ii. Avaliar o desempenho do teste *careHPV™* em diferentes cenários, em unidades fixa e móveis, comparando-os com os resultados citológicos e histopatológicos;
- iii. Realizar a genotipagem dos HPVs das amostras positivas no teste molecular, das amostras obtidas nas unidades móveis e fixa.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Este é um estudo de intervenção, prospectivo, realizado no período de Março a Dezembro de 2012. Dois tratamentos foram alocados aleatoriamente em mulheres atendidas no consultório do Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos; e um tratamento foi realizado em mulheres que realizaram o exame nas unidades móveis da Instituição, envolvendo os Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e São Paulo.

Todas as mulheres participantes, maiores de 18 anos, receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A) específico para esta pesquisa. O mesmo foi assinado após a concordância em participar do estudo. Foi aplicado por profissional de saúde, individualmente, um questionário sócio demográfico estruturado, contendo informações quanto ao uso de tabaco, anticoncepcional, número de filhos e parceiros ao longo da vida (Anexos B e C). Em seguida foram encaminhadas ao consultório para a coleta do material.

A coleta das amostras seguiu uma ordem previamente determinada: a primeira coleta foi destinada para o teste molecular (preservada em meio *careHPV™*) e a segunda para o teste citológico (preservada em meio *SurePath®*). As amostras foram devidamente identificadas com a mesma sequência numérica em todo material coletado: amostras, TCLE, formulário cito-patológico e questionário.

5.2 População e Amostragem

A coleta do material cérvico-vaginal seguiu uma ordem previamente determinada:

- i. A primeira coleta foi destinada para o teste molecular (preservada em meio *careHPV™*). As amostras cérvico-vaginais foram obtidas com a utilização de uma escova cônica (Digene, Qiagen, Gaithersburg, MD, USA), conforme demonstrado no Anexo D. A escova cônica foi inserida no interior do frasco específico, imediatamente após a coleta.

- ii. A segunda coleta foi designada para o teste de Papanicolaou (preservada em meio *SurePath*®). A amostra foi obtida do canal endo e ectocervical, por profissional de saúde, através da utilização de uma escova citológica *Rovers Cervex-Brush Combi* (*Rovers, Netherland*) com haste removível, sendo inserida no respectivo frasco, imediatamente após a coleta.

As amostras foram devidamente identificadas com a mesma sequência numérica em todo material coletado: amostras, TCLE, formulário cito-patológico e questionário. Em todos os cenários de coleta, a segunda amostra foi obtida unicamente por profissionais de saúde, utilizando espéculo vaginal para coletar o material do canal endo e ectocérvico.

5.2.1 Etapa Ambulatorial

Para o tratamento realizado no consultório do Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos, identificado como “unidade fixa”, foram criados dois grupos de coleta: **auto coleta** vs. **coleta profissional**. Os grupos foram igualmente randomizados (Figura 8).

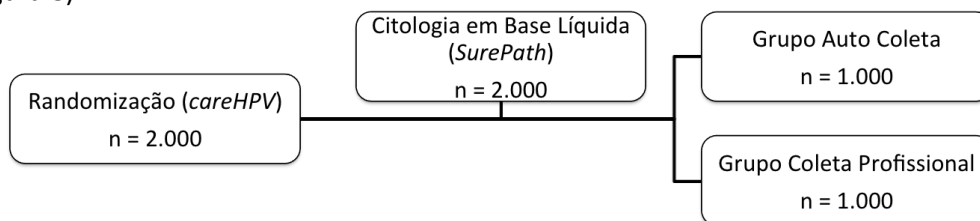


Figura 8 – Esquema de coletas executado na fase ambulatorial (“unidade fixa”).

A randomização e a sequência numérica dos envelopes para o sorteio foram executadas pelo Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP) da Instituição; apenas o estatístico responsável teve conhecimento do conteúdo no interior dos envelopes.

Participaram desta etapa do estudo, 2.000 mulheres, voluntárias, maiores de 18 anos, envolvidas no rastreamento oportunístico realizado na unidade fixa (T4). As participantes foram informadas sobre o *Papilomavirus humano* (HPV), o câncer cervical, a importância de se detectar precocemente possíveis lesões no colo uterino e sobre prevenção do câncer cervical. Após estas informações e a assinatura do TCLE, a participante retirou um envelope na sequência numerada, que a direcionou para o grupo de coleta (auto coleta e/ou coleta

profissional). É importante ressaltarmos que a profissional responsável pela aplicação do sorteio não tinha conhecimento do conteúdo nos envelopes até o momento em que o mesmo foi aberto pela mulher participante. No caso da auto coleta, a profissional instruiu a mulher através de material ilustrativo (Anexo D), como a coleta vaginal deveria ser realizada para o caso de ter sido selecionada para o grupo de auto coleta. Lembrando que, neste caso, a profissional de saúde não permaneceu no local em que a mulher realizaria o procedimento. No caso do grupo cuja amostra foi coletada por profissional de saúde, a mesma explicou à participante como a coleta cervical seria realizada, semelhante à coleta para o exame de Papanicolaou (endo e ectocérvice).

As amostras coletadas em meio *careHPV™* foram entregues no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) à responsável pela pesquisa, para execução das análises estabelecidas. As amostras coletadas para citologia de base líquida (*SurePath®*) foram encaminhadas para o Departamento de Patologia, para a rotina de análise citopatológica.

5.2.2 Etapa Unidades Móveis

Participaram desta etapa 3.079 mulheres, voluntárias, maiores de 18 anos, participantes do rastreio oportunístico oferecido pelas unidades móveis T2, T3, T4 e T5 do Hospital de Câncer de Barretos, que assistiram aos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e São Paulo.

Nesta etapa não houve randomização do grupo de coleta, todas as amostras (teste molecular e Papanicolaou) foram coletadas por profissionais de saúde (Figura 9).

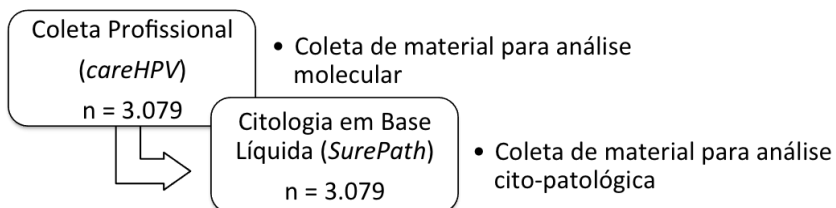


Figura 9 – Coletas executadas na fase unidades móveis.

As amostras em meio *careHPV™*, em um primeiro momento, foram analisadas na própria unidade móvel (T3), durante a permanência da responsável pela pesquisa em dez das 63 cidades visitadas pela unidade, sendo elas: Mineiros (GO), Portelândia (GO), Alto

Araguaia (MT), Alto Garças (MT), Alto Taquari (MT), Rondonópolis (MT), Pedra Preta (MT), Guiratinga (MT), São José do Povo (MT), Itiquira (MT); totalizando mais de 400 amostras analisadas *in loco* (Figuras 10 – 12).

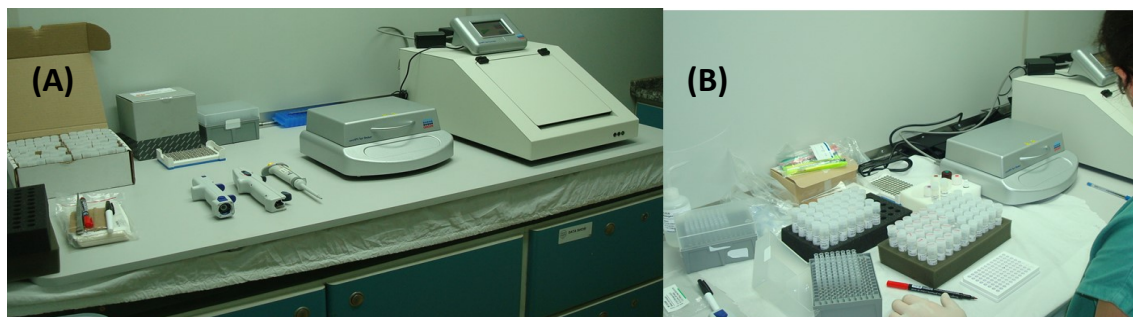


Figura 10 – Interior da unidade móvel – **A)** montagem do equipamento no interior da unidade móvel. **B)** Realização da análise para detecção de hr-HPV.



Figura 11 – Dia de atendimento na unidade móvel. **A)** População aguardando atendimento. **B)** Aplicação do questionário sociodemográfico.



Figura 12 – Equipe de trabalho na unidade móvel. **(A)** Da esquerda para a direita: D. Creusa (Enfermeira); Adriana (responsável pela pesquisa); Lilian (Técnica Enfermagem) e Lidiane (Técnica Enfermagem). **(B)** Eduardo (motorista). **(C)** Carlos Eduardo (Médico).

Durante a realização dos testes na unidade móvel, foram observadas algumas dificuldades quanto à logística do processo no geral, uma vez que o fluxo ideal seria entregar o resultado do teste molecular no mesmo dia. No entanto, como o tempo de permanência nas cidades era curto, fizemos uma “adaptação” no processo, onde criamos uma rotina de análise a cada dois dias. Dessa forma não houve prejuízo no atendimento às mulheres previamente agendadas e tampouco à experiência de realizarmos o teste molecular no interior da unidade móvel. As demais amostras coletadas posteriormente foram armazenadas adequadamente e entregues no CPOM à responsável pela pesquisa e pelas análises do material. O material coletado em base líquida foi encaminhado normalmente ao departamento de Patologia da Instituição para análise citopatológica.

5.3 Análises Laboratoriais

As amostras cérvico-vaginais em meio preservativo *careHPV™* foram mantidas nas seguintes condições:

- 15°C a 30°C: por duas semanas, e/ou
- 2°C a 8°C: por quatro semanas
- -20°C: por dois meses

As amostras cervicais em meio preservativo *SurePath®* foram mantidas no departamento de Patologia em temperatura ambiente. O material restante das amostras positivas foi mantido refrigerado entre 2°C a 8°C.

5.3.1 Teste HPV DNA

O teste molecular HPV DNA foi realizado com o kit de detecção *careHPV™* (Figura 13), capaz de detectar qualitativamente 14 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Na reação ocorre a denaturação das células cérvico-vaginais; com uma hibridização do RNA complementar e a captura dos anticorpos monoclonais revestidos por microesferas magnéticas. Os híbridos nas esferas são detectados por uma solução de fosfatase alcalina que então reage com o substrato quimioluminescente. Este último

reagente promove a emissão de luz de acordo com as moléculas de fosfatase alcalina ligadas ao alvo. Os resultados no sistema são expressos em unidade relativa de luz (RLU) e comparados com a RLU do controle positivo (1pg/ml HPV16 DNA) – *cutoff*. A proporção $RLU/cutoff$ é indicativa de positividade, ilustrada na tela do *controller* (Figura 14)¹².

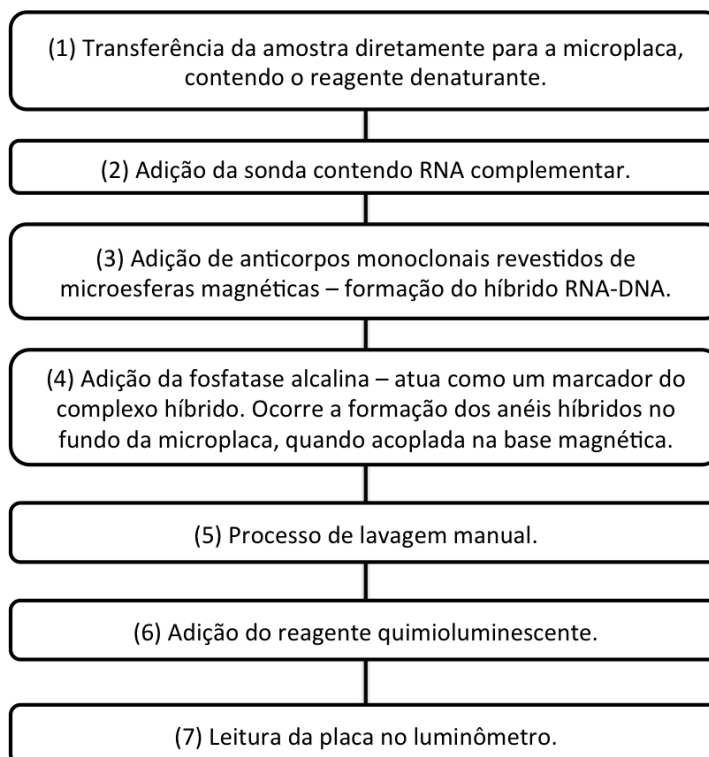


Figura 13 – Fluxograma das reações durante o processo de análise das amostras cérvico-vaginais realizadas com kit *careHPV™*.

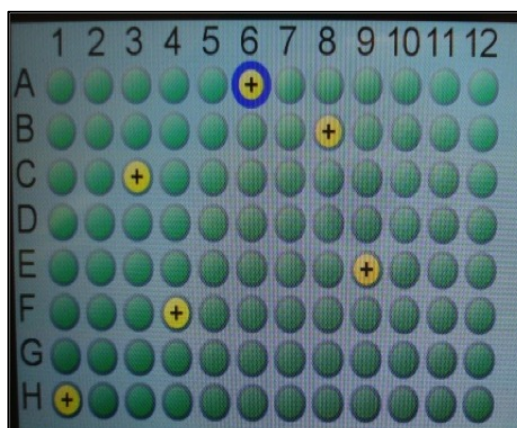


Figura 14 – Imagem do resultado final na tela do *controller* do sistema *careHPV™*. O círculo amarelo indica que a amostra é positiva para hr-HPV. Enquanto que, os círculos verdes indicam que a amostra é negativa para HPV de alto risco. (Fonte: arquivo pessoal).

5.3.2 Teste Papanicolaou

As amostras foram enviadas ao departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. A preparação da lâmina foi realizada por profissional treinado (citotécnicos), uma vez que se trata da rotina do departamento. A leitura das lâminas foi realizada através do equipamento *BD FocalPoint™ GS Imagin System* – composto por *BD FocalPoint™ Slide Profiler* e pelo *BD FocalPoint™ GS Review Station (Becton and Dickinson Corp, USA)*, e revisadas por médicos patologistas.

O Ministério da Saúde do Brasil considera a citologia como método de escolha para rastreamento de câncer cervical. No estudo, estes resultados foram utilizados apenas como método complementar. Os achados citológicos foram classificados segundo os critérios do Sistema *Bethesda*³⁴.

5.4 Critério de Avaliação

As mulheres com resultado positivo no teste *careHPV™* foram convocadas para realizar exames complementares, como colposcopia e/ou biópsia (se necessário) na Instituição, e quando não foi possível comparecer, foram orientadas a procurar atendimento na própria região.

As participantes do estudo foram informadas dos resultados do teste molecular, quando negativos, através de carta (Anexo E) e, aquelas que tiveram seus resultados positivos (Anexo F), foram convocadas por telefone para agendamento do retorno e avaliação complementar. O resultado foi informado pelo médico, no momento da consulta, para eventuais explicações ou questionamentos da participante. A condição para convocá-las foi o exame de HPV DNA positivo para presença do vírus de alto risco e/ou citologia alterada (ASC-H ou mais), como mostrado na Figura 15.

Foram desenvolvidos três modelos de padrão-ouro para avaliação dos modelos de *screening* propostos:

- **GS1:** Corresponde à biópsia do colo. Se a biópsia não foi realizada durante a colposcopia, o padrão-ouro foi a colposcopia: livres de doença (D(-)) se o padrão

coloscópico foi de normalidade ou sugestivo de LSIL; com doença (D(+)) se o padrão coloscópico foi sugestivo de HSIL;

- **GS2:** Corresponde ao padrão-ouro GS1 e, nos casos em que não se fez coloscopia, mulheres com exames Pap(-) e HPV(-) foram consideradas livres de doença (D(-));
- **GS3:** Corresponde ao padrão-ouro GS1 e, nos casos em que não se fez coloscopia, as mulheres com exame HPV(-) foram consideradas livres de doença (D(-)).

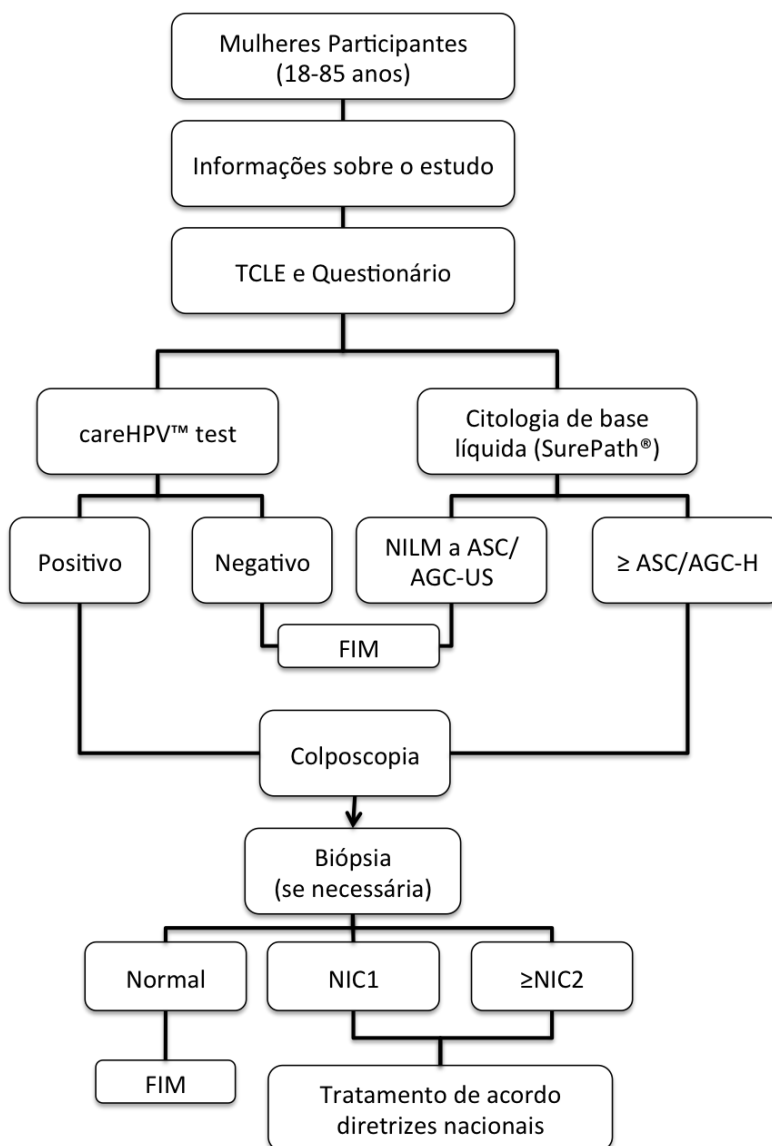


Figura 15 – Fluxograma do critério de avaliação utilizado para convocação das mulheres participantes do estudo.

5.5 Identificação dos tipos de HPV

As amostras positivas para o teste *careHPV™* foram selecionadas para identificação dos tipos de HPV através do método Luminex. As amostras utilizadas foram mantidas a temperatura de -80°C até o momento do preparo para extração do DNA.

5.5.1 Extração de DNA

O DNA das amostras positivas mantidas em meio *careHPV™* foi extraído através do kit *QIAmp MinElute Virus Vacuum* (Qiagen Co), de acordo com o protocolo do fabricante: o material cérvico-vaginal foi tratado com protease para lise celular, seguido da adição de etanol. A protease, juntamente com o *buffer* AL (composto por guanidina) e um *carrier* de RNA, agem para inativar as RNases. O processo de filtração inicia-se com a adição do material tratado nas colunas, onde após a primeira filtração, são adicionados os *buffers* de lavagem e etanol novamente. Por fim, após secagem da membrana na coluna de filtração, o DNA foi eluído em *buffer* EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5), para melhor conservação do DNA. O DNA foi mantido em freezer -20°C.

A adição do álcool no procedimento otimiza a ligação entre RNA viral e DNA na membrana da coluna de filtração (sílica-gel). Os tampões de lavagem atuam para remoção das impurezas.

5.5.2 Tipagem dos HPVs

A tipagem do DNA foi realizada no Centro de Investigação Translacional em Oncologia, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). O material foi analisado através da tecnologia Luminex (Luminex Corporation, TX, USA). Esta metodologia utiliza *beads* de poliestireno (5.6µM) contendo dois diferentes fluoróforos em seu interior, e permite acoplar sondas de oligonucleotídeos. É possível detectar simultaneamente 100 tipos diferentes de HPV utilizando sondas tipo-específicas em uma única reação. Neste estudo, foram utilizadas sondas para identificação de 21 tipos de HPV: i) **baixo risco**: 6, 11 e 70, ii) **alto risco**: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82.

O protocolo foi realizado com a utilização do Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante: considerando uma reação de 25µL, utilizou-se 10µL do DNA extraído. Foram efetuados 45 ciclos de amplificação, de acordo com os parâmetros:

- Denaturação: 30 segundos a 94°C
- Anelamento: 3 minutos a 63°C
- Extensão (alongamento da cadeia): 90 segundos a 72°C.

O primeiro ciclo é precedido por 15 minutos de denaturação a 95°C e o último ciclo é estendido por 10 minutos de alongamento a 72°C. O controle negativo da PCR não continha amostra de DNA, apenas os reagentes da reação.

O produto de PCR foi denaturado e hibridizado com um conjunto de sondas tipo-específica. O material passa por etapa de lavagem com filtro, para remoção do DNA não hibridizado. Após as etapas realizadas, o material foi analisado no *Luminex 200 Reader (Millipore)*, constituído de dois lasers que identificam o local das beads pela cor interna e quantifica a fluorescência.

Foi utilizado um controle de quantificação de *beta*-globina para monitoramento da qualidade do DNA molde. Quando não obtido sinal positivo para *alpha*-HPV e *beta*-globina, a amostra foi considerada inadequada. Aqueles casos em que o sinal positivo para *alpha*-HPV não foi observado, porém a *beta*-globina foi detectada, foram considerados negativos.

5.6 Análise Estatística

Para uma análise estatística adequada, um banco de dados foi criado com todas as informações relevantes de cada uma das participantes do estudo e os resultados obtidos de cada exame realizado. Toda análise estatística foi realizada através dos *softwares* para computador *IBM® SPSS® Statistics (Statistical Package for Social Sciences)* versão 20.1 para Windows (*IBM Corporation, Route 100, Somers, NY 10589*) e *MedCalc®* versão 11.1 para Windows (*Broekstraat 52, B-9030 Mariakerke, Belgium*).

Inicialmente, os dados foram reunidos considerando as estatísticas descritivas, em função da média, desvio padrão, mínimo e máximo quartis para as variáveis quantitativas, e em função da frequência e porcentagem para as qualitativas.

Para as comparações de frequências e entre grupos com variáveis categóricas utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar médias entre os grupos e o teste exato de Fisher foi usado quando os pressupostos do teste de Qui-quadrado não foram satisfatórios para a comparação dos grupos. Para relacionar duas ou mais variáveis com desfecho dicotômico foi utilizada Regressão Logística. Em todo estudo foi considerada a significância de 0,05.

Foram estabelecidos quatro possíveis modelos de *screening* para avaliação estatística dos resultados obtidos nas análises desenvolvidas no estudo:

- a) Citologia ou teste hr-HPV positivos
- b) Citologia e teste hr-HPV, ambos positivos
- c) Somente a citologia alterada (ASC-H+)
- d) Somente o teste hr-HPV positivo (*careHPV™*)

No total, 27 mulheres foram excluídas das análises por apresentarem histerectomia (Figura 16). Entretanto, 17 destas mulheres obtiveram resultado positivo para HPV de alto risco.

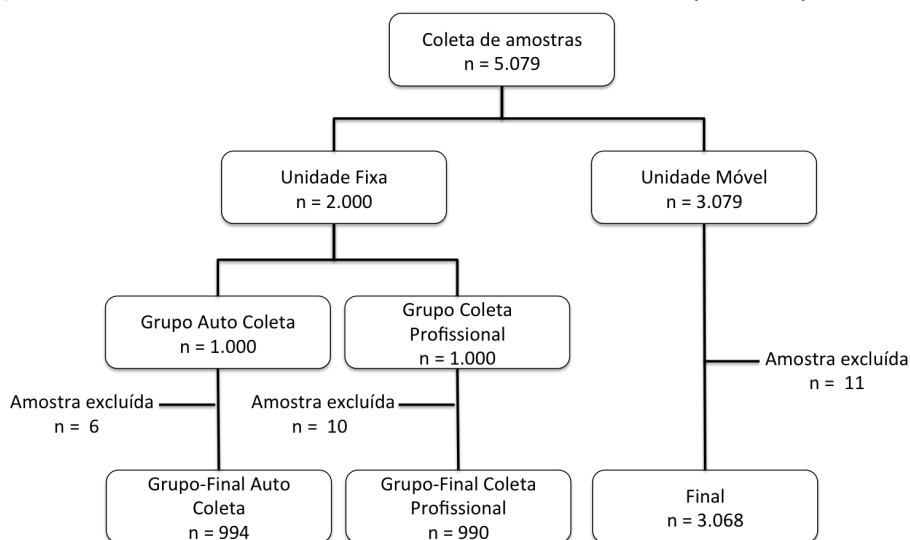


Figura 16 – Fluxograma de exclusão de amostras provenientes de mulheres com histerectomia.

5.7 Aspectos Éticos

As mulheres que concordaram em participar deste estudo foram previamente informadas dos objetivos e das possíveis aplicações futuras oriundas dos resultados deste projeto. Elas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Anexo A, específico para este estudo, permitindo que as amostras coletadas fossem utilizadas nas análises descritas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, protocolo número 404/2010 (Anexo G).

5.8 Financiamento

Os kits para o teste *careHPV™*, bem como os equipamentos, meios de preservação, material de consumo e escovas para o teste molecular, foram fornecidos pela empresa Qiagen® do Brasil..

A aluna teve suporte financeiro (bolsa-auxílio) do Instituto Nacional de Pesquisa e Tecnologia em HPV (INCT – HPV) de São Paulo, através dos auxílios CNPq processo nº 573799/2008-3 e FAPESP processo nº 2008/57889-1, através. E processo CNPq nº 203348/2014-1, contemplado com bolsa de doutorado *sandwich* no exterior.

Os *vials* e insumos para citologia em base líquida *SurePath®* são rotineiramente utilizados pelo hospital em suas unidades móveis e nos consultórios do Departamento de Prevenção da Instituição.

6 RESULTADOS

No total, foram coletadas 5.079 amostras cérvico-vaginais de mulheres com idade entre 18 e 85 anos, para realização das análises propostas para detecção de HPV de alto risco e análise citológica entre os grupos e unidades de coleta.

6.1 Amostras ambulatoriais (unidade fixa)

Na unidade fixa – ambulatório de prevenção do Hospital de Câncer de Barretos – 2.000 participantes foram envolvidas no estudo, divididas entre os dois subgrupos de coleta previamente determinados, auto coleta vs. profissional.

A faixa etária do grupo geral variou de 18 a 77 anos, com média de 46,3 anos (SD=11,83). Ao considerarmos apenas grupo negativo e positivo para HPV de alto risco, encontramos uma média de 45,8 e 38,4 anos, respectivamente. Dentre os subgrupos, obtivemos a média de 44,5 anos para auto coleta e 45,6 anos para coleta profissional. Ao analisarmos a diferença de idade entre os subgrupos de coleta, foi encontrada diferença estatística significativa pelo teste *t-Student* ($p=0,034$). Na tabela 1, estão compilados os dados da casuística estudada, distribuídos por grupo de coleta.

Tabela 1 – Distribuição dos dados gerais da população estudada na unidade fixa, de acordo com os grupos de coleta (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Características	Frequência [n(%)] ⁽¹⁾	
	Grupo Auto Coleta	Grupo Coleta Profissional
Idade (anos)	994	990
>25	64 (6,4)	46 (4,6)
25 – 34	165 (16,6)	139 (14,0)
35 – 44	241 (24,2)	263 (26,6)
45 – 54	325 (32,7)	302 (30,5)
≥ 55	199 (20,0)	240 (24,2)
Papanicolaou Prévio	978	981
Sim	942 (96,3)	946 (96,4)
Não	36 (3,7)	35 (3,6)
Consumo de Tabaco	983	983
Sim	114 (11,6)	114 (11,6)
Não	869 (88,4)	869 (88,4)
Uso de Anticoncepcional	979	976
Sim	165 (16,9)	158 (16,2)
Não	814 (83,1)	818 (83,8)
Número de Filhos	986	985
Nenhum	146 (14,8)	132 (13,4)
1-3	717 (72,7)	735 (74,6)
4-6	107 (10,9)	109 (11,1)
>6	16 (1,6)	9 (0,9)
Múltiplos Parceiros ⁽²⁾	952	936
Não (apenas um)	576 (60,5)	569 (60,8)
Sim	376 (39,5)	367 (39,2)
Citologia	993 ^(a)	989 ^(a)
NILM	951 (95,8)	954 (96,5)
ASC/AGC-US	10 (1,0)	15 (1,5)
ASC/AGC-H	11 (1,1)	3 (0,3)
LSIL	17 (1,7)	16 (1,6)
HSIL	4 (0,4)	1 (0,1)
Teste careHPV™	993 ^(a)	989
Negativo	864 (87,0)	889 (89,9)
Positivo	129 (13,0)	100 (10,1)
Tipagem	105 ^(b)	80 ^(c)
Infecção Simples (apenas um tipo HPV)	13 (12,4)	15 (18,75)
Múltipla infecção	92 (87,6)	65 (81,25)

(1) Foram desconsideradas da análise aquelas informações não fornecidas pela participante.

(2) Considerados mais de um parceiro sexual ao longo da vida.

(a) Uma amostra insatisfatória no teste, (b) Valor desconhecido em onze amostras. (c) Valor desconhecido em cinco amostras. NILM = negativo para lesão intraepitelial ou malignidade; ASC/AGC-US = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado; ASC/AGC-H = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado, não se afasta lesão de alto grau; LSIL = lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; HSIL = lesão escamosa intraepitelial de alto grau.

Dentre os resultados obtidos no teste *careHPV™* para HPV de alto risco, foi encontrada uma positividade de 11,5% (229). O teste de Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar frequências entre os grupos de coleta (auto coleta vs. profissional) para positividade de hr-HPV: 13,0% (129) foram encontrado no grupo de auto coleta e outros 10,1% (100) no grupo de coleta profissional. Os resultados foram estatisticamente significativos ($p=0,044$, teste Qui-quadrado e 0,05 de significância). Entretanto, os dados sugerem que os grupos de coletas são semelhantes, apesar da diferença estatística apresentada. Observamos que a maioria (96,4%) das mulheres que participaram do estudo realizou pelo menos um exame preventivo (Papanicolaou) anteriormente e, não foi encontrada diferença estatística significativa quando comparamos os grupos de coletas quanto ao número de filhos, número de parceiros, uso de tabaco e consumo de contraceptivos ($p>0,05$).

6.2 Amostras das unidades móveis

Na etapa desenvolvida nas unidades móveis, participaram 3.079 mulheres. A faixa etária deste grupo foi de 18 a 85 anos. A média de idade entre as mulheres envolvidas nesta etapa foi de 46,3 anos (SD = 12,4). Em relação aos resultados negativo e positivo na análise molecular, a média de idade foi de 46,9 e 41,0 anos, respectivamente. Essa diferença estatística foi significativa pelo teste *t de Student* ($p<0,0001$). Dentre os resultados obtidos no teste molecular *careHPV™* para HPV de alto risco, encontramos 10,0% (307) de positividade.

A tabela 2 mostra a distribuição dos dados gerais da população estudada nas unidades móveis. Observou-se que a maioria (94,5%) das mulheres que participaram do estudo, fez pelo menos um exame preventivo (Papanicolaou) anteriormente.

Tabela 2 – Distribuição dos dados gerais da população estudada na unidade móvel (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

	Frequências [n(%)]⁽¹⁾
Idade (anos)	3.068
>25	115 (3,7)
25 – 34	477 (15,5)
35 – 44	740 (24,1)
45 – 54	918 (29,9)
≥ 55	818 (26,7)
Papanicolaou Prévio	3.059
Sim	2.927 (95,7)
Não	132 (4,3)
Consumo de Tabaco	3.064
Sim	426 (13,9)
Não	2.638 (86,1)
Uso de Anticoncepcional	3.060
Sim	545 (17,8)
Não	2.515 (82,2)
Número de Filhos	3.063
Nenhum	252 (8,2)
1-3	2.055 (67,1)
4-6	596 (19,5)
>6	160 (5,2)
Múltiplos Parceiros Sexuais⁽²⁾	3.034
Não (apenas um)	1.779 (58,6)
Sim	1.255 (41,4)
Citologia	3.068
NILM	2.936 (95,7)
ASC/AGC-US	66 (2,2)
ASC/AGC-H	13 (0,4)
LSIL	38 (1,2)
HSIL	15 (0,5)
Teste <i>careHPV</i>TM	3.068
Negativo	2.761 (90,0)
Positivo	307 (10,0)
Tipagem	258^(a)
Infecção Simples (apenas um tipo HPV)	84 (32,6)
Múltipla infecção	174 (67,4)

(1) Foram desconsideradas da análise aquelas informações não fornecidas pela participante. (2) Considerado mais de um parceiro sexual ao longo da vida. (a) Valor desconhecido em dez amostras. NILM = negativo para lesão intraepitelial ou malignidade; ASC-US = células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H = células escamosas atípicas de significado indeterminado, mas não se afasta lesão de alto grau; LSIL = lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; HSIL = lesão escamosa intraepitelial de alto grau; AGC-US = células atípicas glandulares de significado indeterminado; AGC-H = células atípicas glandular de significado indeterminado, mas não se pode afastar lesão de alto grau.

Quando comparamos os resultados do teste molecular às variáveis sociodemográficas idade, número de filhos, múltiplos parceiros e uso de contraceptivo oral, foi encontrada uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$); entretanto, essa diferença não foi observada em relação hábito de fumar ($p = 0,148$), pelo teste de Qui-Quadrado e 0,05 de significância.

6.3 Desempenho do teste *careHPV™* nos diferentes cenários de coleta

6.3.1 Unidade Fixa

A maioria das mulheres hr-HPV positivas, em ambos os grupos de coleta, pertenciam ao grupo de mulheres consideradas saudáveis (NILM) pela citologia. Na tabela 3 podemos observar a relação entre os resultados da citologia com o teste molecular de acordo com o grupo de coleta. Os valores encontrados diferiram estatisticamente (teste Exato de Fisher, $p < 0,0001$).

Tabela 3 – Resultados citológicos associados aos resultados do teste molecular *careHPV™*, na unidade fixa (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Grupo	Teste <i>careHPV™</i>					
	Auto coleta			Profissional de Saúde		
Citologia	Negativo ⁽¹⁾	Positivo	Valor p	Negativo ⁽¹⁾	Positivo	Valor p
NILM	89,1% (847)	10,9% (104)		91,3% (871)	8,7% (83)	
ASC/AGC-US	60,0% (6)	40,0% (04)		80,0% (12)	20,0% (3)	
ASC/AGC-H	54,5% (6)	45,5% (05)	$<0,0001^{(a)}$	66,7% (2)	33,3% (1)	$<0,0001^{(a)}$
LSIL	17,6% (3)	82,4% (14)		25,0% (4)	75,0% (12)	
HSIL	50,0% (2)	50,0% (2)		0,0% (0)	100,0% (1)	
Total	87,0% (864)	13,0% (129)		89,9% (889)	10,1% (100)	

NILM = negativo para lesão intraepitelial ou malignidade; ASC/AGC-US = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado; ASC/AGC-H = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado, mas não se afasta lesão de alto grau; LSIL = lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; HSIL = lesão escamosa intraepitelial de alto grau.

(a) Teste Exato de *Fisher*, com 0,05 de significância.

(1) Uma amostra foi excluída da análise por apresentar resultado insatisfatório.

6.3.2 Unidades Móveis

Nas unidades móveis, observou-se que 78,2% (240/307) das mulheres positivas para o teste de hr-HPV foram consideradas pela citologia como mulheres saudáveis (NILM). A tabela 4 apresenta a comparação dos resultados obtidos no teste molecular em relação ao diagnóstico citológico.

Tabela 4 – Resultados citológicos relativos ao teste *careHPV™* nas unidades móveis (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

	<i>Teste careHPV™</i>		Valor de p ^(a)
	Negativo	Positivo	
NILM	91,8% (2696)	8,2% (240)	
ASC/AGC-US	60,6% (40)	39,4% (26)	
ASC/AGC-H	61,5% (08)	38,5% (05)	
LSIL	44,7% (17)	55,3% (21)	<0,0001
HSIL	0,0% (0)	100,0% (15)	
Total	90,0% (2761)	10,0% (307)	

NILM = negativo para lesão intraepitelial ou malignidade; ASC/AGC-US = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado; ASC/AGC-H = células escamosas/glandulares atípicas de significado indeterminado, mas não se afasta lesão de alto grau; LSIL = lesão escamosa intraepitelial de baixo grau; HSIL = lesão escamosa intraepitelial de alto grau.

(a) Teste Exato de Fisher, com 0,05 de significância.

Como era esperado, os resultados citológicos das unidades móveis e fixa mostraram frequências distintas e significativas ($p < 0,05$). A proporção de resultados negativos foi algo semelhante, sem diferenças importantes; entretanto, houve maior frequência de alterações citológicas menores nas pacientes atendidas na unidade fixa do que aquelas nas unidades móveis. Contudo, as lesões de alto grau foram significativamente maiores nas mulheres atendidas nas unidades móveis, o que talvez reflita o isolamento dessas mulheres aos centros de atendimento médico regular.

6.3.3 Colposcopia e Biópsia

Tanto na unidade móvel quanto na fixa, todas as mulheres que tiveram citologia alterada (ASC-H+) e/ou resultado do teste de hr-HPV positivo foram convocadas para comparecer ao Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos para realização dos exames complementares (colposcopia e/ou biópsia). Ao todo, 578 (11,4%) mulheres corresponderam ao critério de avaliação, conforme descrito previamente.

Para que não houvesse comprometimento no atendimento, tanto na rotina do departamento de Prevenção, quanto às mulheres que foram inseridas no sistema devido à pesquisa, um médico especialista foi exclusivamente destacado para realizar as referidas colposcopias.

Dentre as participantes convocadas, 46,9% (271) compareceram para realização dos exames complementares (colposcopia), e destas, 53,5% (145) foram biopsiadas. Ao dividirmos por unidade de atendimento (fixa ou móvel), obtivemos as frequências apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Frequências de comparecimento para os exames complementares, relativo àquelas mulheres que tiveram citologia alterada e/ou teste de HPV positivo (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

	N total	Unidade		
		Móvel	Auto coleta	Fixa
COLPOSCOPIA				
Não ^(a)	307	66,6% (221)	36,4% (51)	33,0% (35)
Sim	271	33,4% (111)	63,6% (89)	67,0% (71)
BIÓPSIA				
Não ^(a)	126	40,5% (45)	51,7% (46)	49,3% (35)
Sim	145	59,5% (66)	48,3% (43)	50,7% (36)

(a) Mulheres que não comparecerem à consulta de *follow-up*.

A tabela 6 apresenta a distribuição dos resultados obtidos nos exames de colposcopia e biópsia nas mulheres que foram convocadas para realizar o *follow-up*.

Tabela 6 - Distribuição dos resultados obtidos nos exames complementares das mulheres que foram convocadas de acordo com o critério estabelecido (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Características	N Total	Unidade		
		Móvel	Fixa	
		Prof. de Saúde	Auto coleta	Prof. de Saúde
COLPOSCOPIA	271⁽¹⁾			
Dentro dos padrões de normalidade		24,3% (27)	37,5% (33)	33,8% (24)
Consistente com neoplasia de baixo grau		36,0% (40)	29,5% (26)	35,2% (25)
Consistente com neoplasia de alto grau		7,2% (8)	5,7% (5)	4,2% (3)
Insatisfatória		32,4% (36)	27,3% (24)	26,8% (19)
BIÓPSIA	145⁽²⁾			
Cervicite Crônica		40,9% (27)	39,5% (17)	34,3% (12)
NIC1		40,9% (27)	41,9% (18)	42,9% (15)
NIC2		7,6% (5)	4,7% (2)	5,7% (2)
NIC3/Carcinoma in situ		6,1% (4)	7,0% (3)	8,6% (3)
Carc. Espinocelular (CEC)		3,0% (2)	0,0% (0)	0,0% (0)
Carcinoma escamoso invasor		1,5% (1)	2,3% (1)	5,7% (2)
Sem atipias		0,0% (0)	4,7% (2)	2,9% (1)

(1) Um *follow-up* foi perdido. Não consta informação de laudo da colposcopia no prontuário da paciente. (2) Uma das amostras analisadas obteve resultado insatisfatório.

Na unidade fixa, dentre os três casos com resultados positivo para o teste de HPV e citologia HSIL, uma das participantes convocadas (coleta por profissional de saúde) não compareceu para seguimento. As outras duas tiveram colposcopia sugestiva para lesão de alto grau e na biópsia foram diagnosticadas com carcinoma invasor e NIC3. As pacientes, ambas realizaram auto coleta, tinham 25 e 48 anos, com colposcopia realizada em tempo menor ou igual a 90 dias. As duas participantes que apresentaram citologia HSIL e HPV de alto risco não detectado no teste molecular tinham 50 e 64 anos, realizaram seguimento,

com colposcopia insatisfatória e dentro dos padrões de normalidade, e biópsia NIC1 e NIC3, respectivamente. A colposcopia foi realizada com 333 e 64 dias.

No grupo das unidades móveis, dentre os 15 casos de citologia HSIL e teste de hr-HPV positivo, sete não compareceram nas consultas de seguimento. Aquelas que realizaram colposcopia, quatro foram sugestivas de lesão de alto grau, três sugestivas de lesão de baixo grau e uma com avaliação dentro dos padrões de normalidade. Na biópsia, os diagnósticos foram: dois casos de NIC1, dois NIC2, um NIC3, dois carcinoma espinocelular (CEC) e um carcinoma invasor. A idade média destas pacientes foi de 37,6 anos, com colposcopia realizada entre 55 e 118 dias.

Considerando-se que a maioria dos programas de *screening* é estabelecida com mulheres acima dos 30 anos, fizemos um gráfico comparativo (Figura 17), onde conseguimos observar a frequência de mulheres com idade menor ou maior de 30 anos, a partir dos resultados alterados obtidos nas análises realizadas.

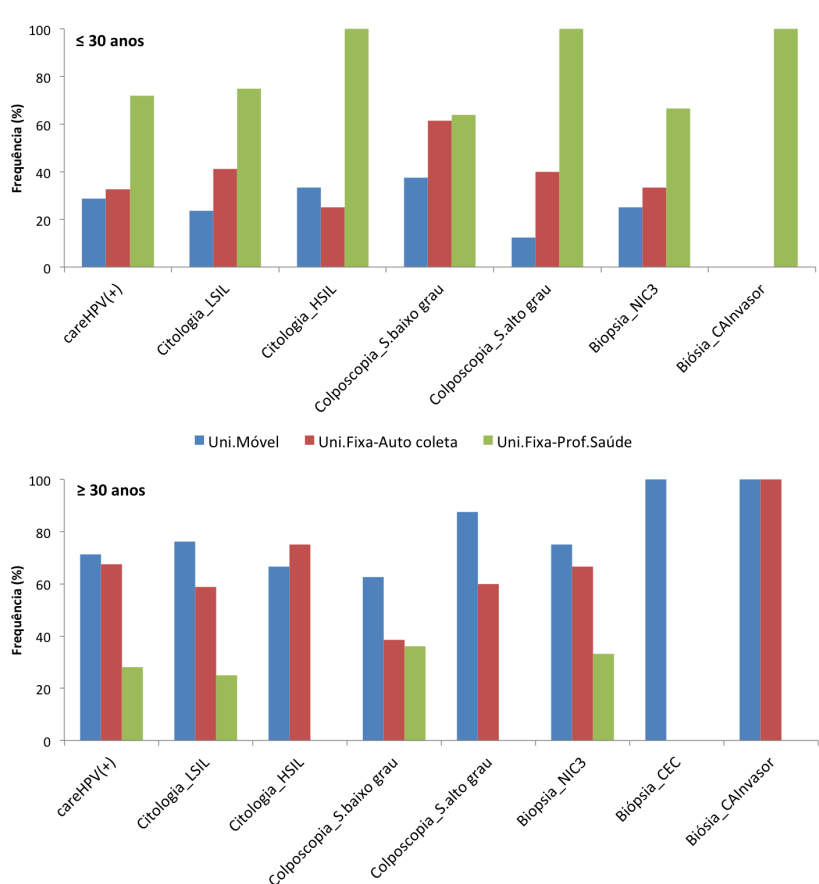


Figura 17 – Distribuição de mulheres com idade menor ou maior a 30 anos, com resultados alterados, divididas por grupo e unidade de coleta.

6.4 Modelos de *Screening* e *Gold Standard (GS)*

Os modelos de *screening* mostraram diferentes performances conforme as estratégias propostas anteriormente. Nas tabelas 7 a 9, é possível observar os resultados obtidos em relação à acurácia dos testes utilizados, de acordo com o local de coleta e o rastreamento utilizado a distribuição dos casos de acordo com o local da coleta e o rastreamento utilizado. As figuras de 18 a 20 representam as curvas ROC de cada um dos modelos de *screening* considerados, de acordo com cada um dos *Gold Standards* utilizados.

Tabela 7 – Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro GS1. (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Unidade/grupo de coleta	Padrão de rastreamento	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	Valor preditivo positivo (IC95%)	Valor preditivo negativo (IC95%)	AUC (IC95%)
Móvel/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	NA	NA	13,5% (7,4 – 22,0)	NA	NA
	Pap (+) e HPV (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	75,9% (65,3 – 84,6)	33,3% (17,3 – 52,8)	95,5 (87,3 – 99,1)	0,76 (0,62 – 0,91)
	Pap (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	65,1% (53,8 – 75,2)	25,6% (13,0 – 42,1)	94,7 (85,4 – 99,0)	0,71 (0,56 – 0,86)
	HPV (+)	100,0% (75,3 – 100)	10,8% (5,1 – 19,6)	14,9% (8,2 – 24,2)	100,0% (66,4 – 100)	0,55 (0,40 – 0,71)
Fixa/ Auto coleta	Pap (+) ou HPV (+)	NA	NA	10,3% (4,5 – 19,2)	NA	NA
	Pap (+) e HPV (+)	75,0% (34,9 – 96,8)	78,6% (67,1 – 87,5)	28,6% (11,3 – 52,2)	96,5% (87,9 – 99,6)	0,77 (0,59 – 0,95)
	Pap (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	68,6% (56,4 – 79,2)	24,1% (10,3 – 43,5)	98,0% (89,2 – 100,0)	0,78 (0,63 – 0,93)
	HPV (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	10,0% (4,1 – 19,5)	10,0% (4,1 – 19,5)	87,5% (47,4 – 99,7)	0,49 (0,27 – 0,70)
Fixa/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	NA	NA	14,3% (6,8 – 25,4)	NA	NA
	Pap (+) e HPV (+)	11,1% (0,3 – 48,3)	85,2% (72,9 – 93,4)	11,1% (0,3 – 48,3)	85,2% (72,9 – 93,4)	0,48 (0,28 – 0,68)
	Pap (+)	44,4% (13,7 – 78,8)	72,2% (58,4 – 83,5)	21,1% (6,1 – 45,6)	88,6% (75,4 – 96,2)	0,58 (0,37 – 0,79)
	HPV (+)	66,7% (29,9 – 92,5)	13,0% (5,4 – 24,9)	11,32% (4,3 – 23,0)	70,0% (34,8 – 93,3)	0,40 (0,18 – 0,62)

AUC: Área sob a curva ROC (area under the ROC curve). IC95%: Intervalos de confiança de 95%.

NA: Não avaliável porque mulheres com exames Pap (-) e HPV (-) não foram convocadas para colposcopia.

Tabela 8 – Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro GS2. (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Unidade/grupo de coleta	Padrão de rastreamento	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	Valor preditivo positivo (IC95%)	Valor preditivo negativo (IC95%)	AUC (IC95%)
Móvel/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (75,3 – 100)	97,0% (96,3 – 97,6)	13,5% (7,4 – 22,0)	100,0% (99,9 – 100)	0,99 (0,98 – 0,99)
	Pap (+) e HPV (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	99,3% (98,9 – 99,6)	33,3% (17,3 – 52,8)	99,9% (99,7 – 100)	0,88 (0,74 – 1,00)
	Pap (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	99,0% (98,5 – 99,3)	25,6% (13,0 – 42,1)	99,9% (99,7 – 100)	0,88 (0,74 – 1,00)
	HPV (+)	100,0% (75,3 – 100)	97,3% (96,7 – 97,9)	14,9% (8,2 – 24,2)	100,0% (99,9 – 100)	0,99 (0,98 – 0,99)
Fixa/Auto coleta	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (63,1 – 100)	92,4% (90,5 – 94,0)	10,3% (4,5 – 19,2)	100,0% (99,6 – 100)	0,96 (0,94 – 0,98)
	Pap (+) e HPV (+)	75,0% (34,9 – 96,8)	98,4% (97,3 – 99,1)	28,6% (11,3 – 52,2)	99,8% (99,2 – 100)	0,87 (0,69 – 1,00)
	Pap (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	97,6% (96,4 – 98,5)	24,1% (10,3 – 43,5)	99,9% (99,4 – 100)	0,93 (0,79 – 1,00)
	HPV (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	93,1% (91,3 – 94,7)	10,0% (4,1 – 19,5)	99,9% (99,4 – 100)	0,90 (0,77 – 1,00)
Fixa/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (66,4 – 100)	94,2% (92,5 – 96,0)	14,3% (6,8 – 25,4)	100,0% (99,6 – 100)	0,97 (0,96 – 0,99)
	Pap (+) e HPV (+)	11,1% (0,3 – 48,3)	99,1% (98,3 – 99,6)	11,1% (0,3 – 48,3)	99,1% (98,3 – 99,6)	0,55 (0,35 – 0,76)
	Pap (+)	44,4% (13,7 – 78,8)	98,4% (97,3 – 99,1)	21,1% (6,1 – 45,6)	99,5% (98,7 – 99,8)	0,71 (0,50 – 0,93)
	HPV (+)	66,7% (29,9 – 92,5)	94,9% (93,3 – 96,2)	11,3% (4,3 – 23,0)	99,7% (99,0 – 99,9)	0,81 (0,62 – 0,99)

AUC: Área sob a curva ROC (area under the ROC curve). IC95%: Intervalos de confiança de 95%.

NA: Não avaliável porque mulheres com exames Pap (-) e HPV (-) não foram convocadas para colposcopia.

Tabela 9 – Análise de acurácia de acordo com o local da coleta e o tipo de rastreamento. Padrão - Ouro GS3. (Hospital de Câncer de Barretos, 2012).

Unidade/grupo de coleta	Padrão de rastreamento	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	Valor preditivo positivo (IC95%)	Valor preditivo negativo (IC95%)	AUC (IC95%)
Móvel/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (75,3 – 100)	95,1% (94,2 – 95,9)	8,5% (4,6 – 14,2)	100,0% (99,9 – 100)	0,98 (0,97 – 0,99)
	Pap (+) e HPV (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	99,3% (98,9 – 99,6)	33,3% (17,3 – 52,8)	99,9% (99,7 – 100)	0,88 (0,74 – 1,00)
	Pap (+)	76,9% (46,2 – 95,0)	97,0% (96,3 – 97,6)	10,5% (5,2 – 18,5)	99,9% (99,7 – 100)	0,87 (0,73 – 1,00)
	HPV (+)	100,0% (75,3 – 100)	97,4% (96,7 – 97,9)	14,9% (8,2 – 24,2)	100,0% (99,9 – 100)	0,99 (0,98 – 0,99)
Fixa/ Auto coleta	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (63,1 – 100)	91,5% (89,5 – 93,2)	9,2% (4,1 – 17,3)	100,0% (99,6 – 100)	0,96 (0,94 – 0,98)
	Pap (+) e HPV (+)	75,0% (34,9 – 96,8)	98,4% (97,3 – 99,1)	28,6% (11,3 – 52,2)	99,8% (99,2 – 100)	0,87 (0,69 – 1,00)
	Pap (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	96,7% (95,3 – 97,7)	18,4% (7,7 – 34,3)	99,9% (99,4 – 100)	0,92 (0,79 – 1,00)
	HPV (+)	87,5% (47,4 – 99,7)	93,2% (91,4 – 94,7)	10,0% (4,1 – 19,5)	99,9% (99,4 – 100)	0,90 (0,77 – 1,00)
Fixa/Profissional Saúde	Pap (+) ou HPV (+)	100,0% (66,4 – 100)	93,4% (91,6 – 94,9)	12,7% (6,0 – 22,7)	100,0% (99,6 – 100)	0,97 (0,95 – 0,98)
	Pap (+) e HPV (+)	11,1% (0,3 – 48,3)	99,1% (98,3 – 99,6)	11,1% (0,3 – 48,3)	99,1% (98,3 – 99,6)	0,55 (0,35 – 0,76)
	Pap (+)	44,4% (13,7 – 78,8)	97,5% (96,3 – 98,4)	14,8% (4,2 – 33,7)	99,5% (98,7 – 99,8)	0,71 (0,50 – 0,92)
	HPV (+)	66,7% (29,9 – 92,5)	95,0% (93,4 – 96,3)	11,3% (4,3 – 23,0)	99,7% (99,0 – 99,9)	0,81 (0,62 – 0,99)

AUC: Área sob a curva ROC (area under the ROC curve).

IC95%: Intervalos de confiança de 95%.

NA: Não avaliável porque mulheres com exames Pap (-) e HPV (-) não foram convocadas para colposcopia.

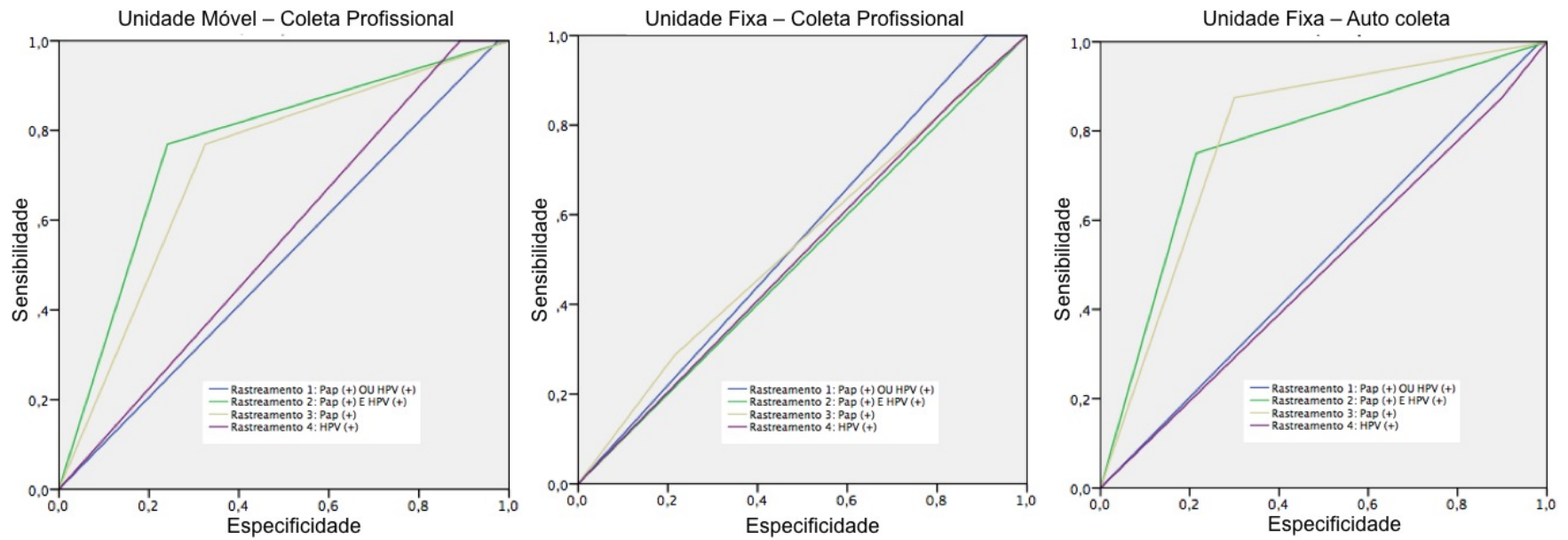


Figura 18 – Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS1, separados por unidade, por grupo de coleta.

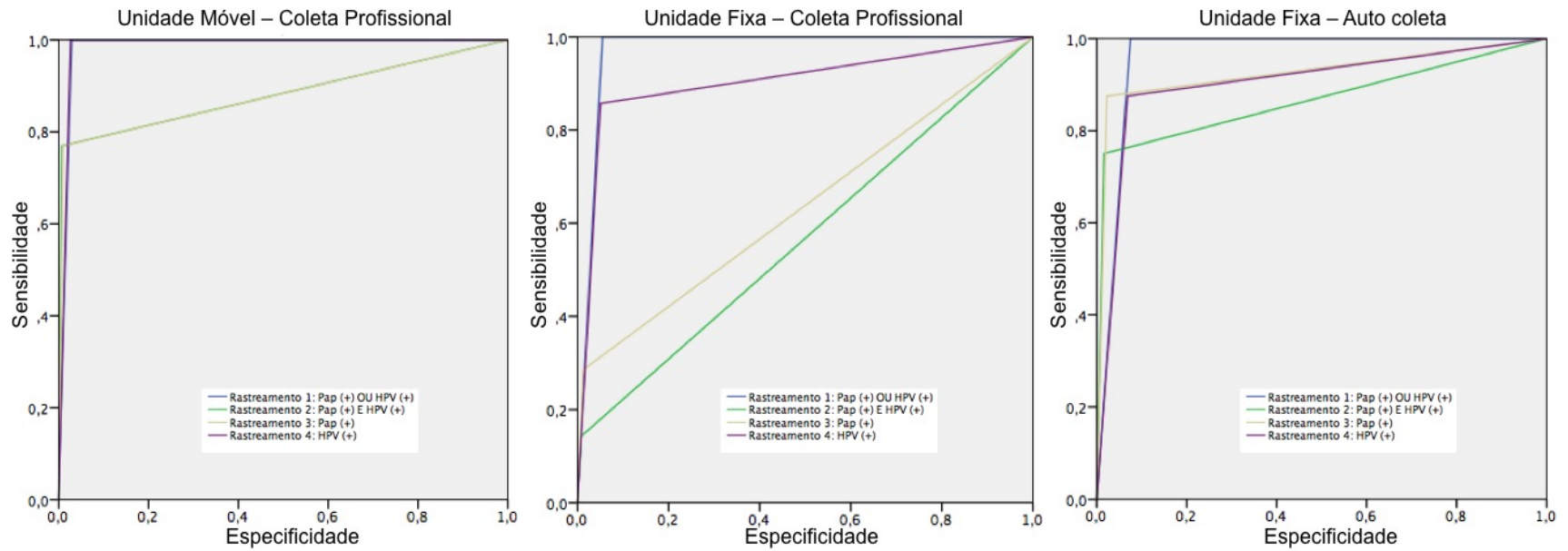


Figura 19 – Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS2, separados por unidade, por grupo de coleta.

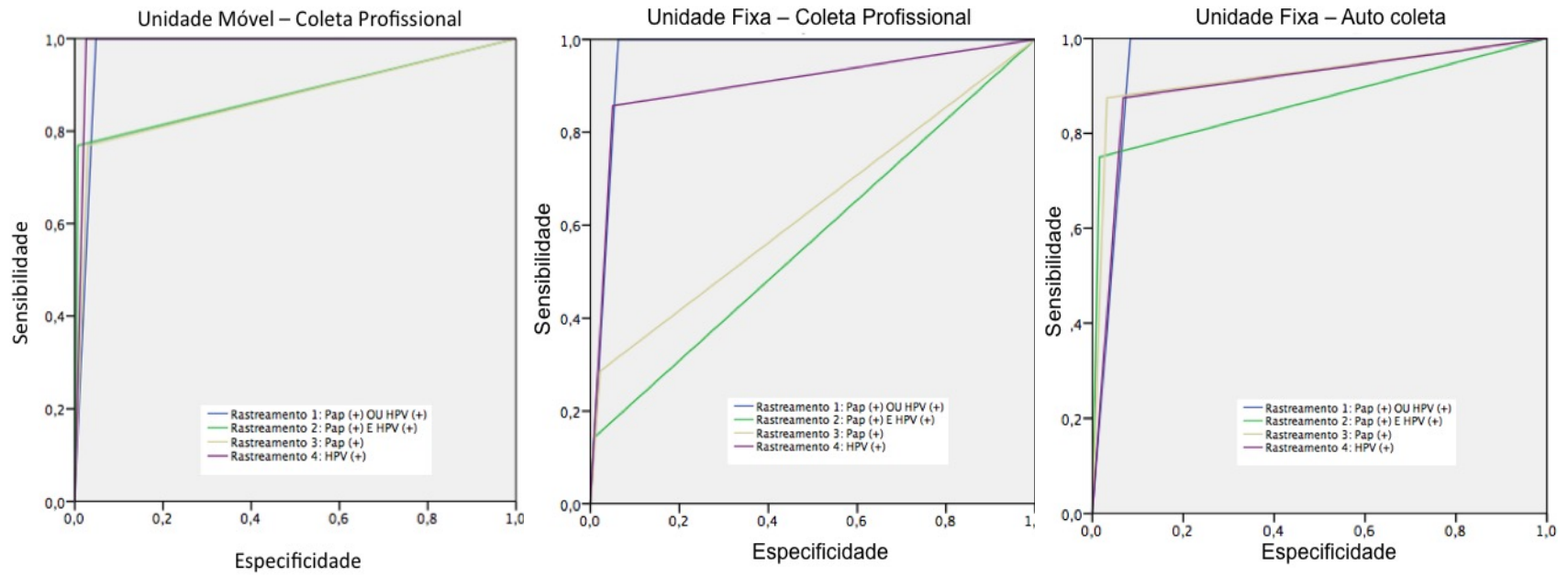


Figura 20 – Curvas ROC baseadas no Padrão-Ouro GS3, separados por unidade, por grupo de coleta.

6.5 Tipagem dos HPVs

Dentre as 578 amostras selecionadas para seguimento, de acordo com o critério de avaliação pré-estabelecido, foram analisados 515 (89%) DNAs extraídos das amostras coletadas em meio *careHPV™*, nas duas unidades de coleta (fixa e móvel). Um grupo de 22 (4,3%) amostras apresentou resultado inadequado na metodologia utilizada para genotipagem, outro de 50 (9,7%) amostras obteve resultado negativo para os tipos avaliados, e ambos foram excluídos das análises estatísticas. A tabela 10 apresenta a distribuição geral dos resultados quanto à positividade e o tipo de infecção encontrada.

Tabela 10 – Distribuição dos resultados obtidos no teste de genotipagem de DNAs (Hospital de Câncer de Barretos, 2012/ICESP/INCT-HPV, 2014-2015).

		Frequências [n(%)]		
		Unidade		
		Móvel	Fixa	
		Prof. Saúde	Auto coleta	Prof. Saúde
Infecção	443			
HPV alto risco	369	86,4% (223)	77,1% (81)	81,3% (65)
HPV baixo risco ^(a)	2	0,4% (1)	0,0% (0)	1,3% (1)
HPV alto e baixo risco	72	13,2% (34)	22,9% (24)	17,5% (14)

(a) As duas amostras foram positivas para HPV-6.

As amostras negativas na genotipagem estavam distribuídas entre as duas unidades de coleta, sendo 68,0% (34) na unidade móvel e 32,0% (16) na fixa: 37,5% (6) no grupo de auto coleta e 62,5% (10) no grupo da coleta profissional.

Todos os 21 tipos de HPV presentes na metodologia utilizada foram detectados na análise. Considerando apenas os casos positivos para HPV, foi observada, no geral, infecção por um único tipo de HPV em 25,3% (112/443) das amostras, duas delas por HPV de baixo

risco (HPV 6). Entretanto, 74,7% (331/443) das amostras apresentaram múltipla infecção, quer entre os tipos de alto risco ou quer dentre os HPV's de alto e baixo risco.

Dentre as amostras HPV positivas, os HPV-56 e HPV-51 foram os tipos mais comuns, sendo detectados em 32,3% e 31,4% das amostras, respectivamente. O que representaria cerca de 3,7% de positividade, se considerarmos a porcentagem de mulheres HPV positivas encontradas neste estudo (11,5%). Em sequência, os tipos HPV-53 (20,5%), HPV-18 (18,5%), HPV-58 (17,6%), HPV-52 (16,0%) e HPV-16 (15,6%) foram os mais frequentes. Se seguirmos o mesmo raciocínio anterior, encontraríamos na realidade, uma prevalência de 2,35%, 2,12%, 2,02%, 1,84% e 1,80%, respectivamente. Em relação aos HPV's de baixo risco, o tipo HPV-6 foi detectado em cerca de 12,9% das amostras. Os tipos menos frequentes (<3%) foram: HPV-70, HPV-11 e HPV-26.

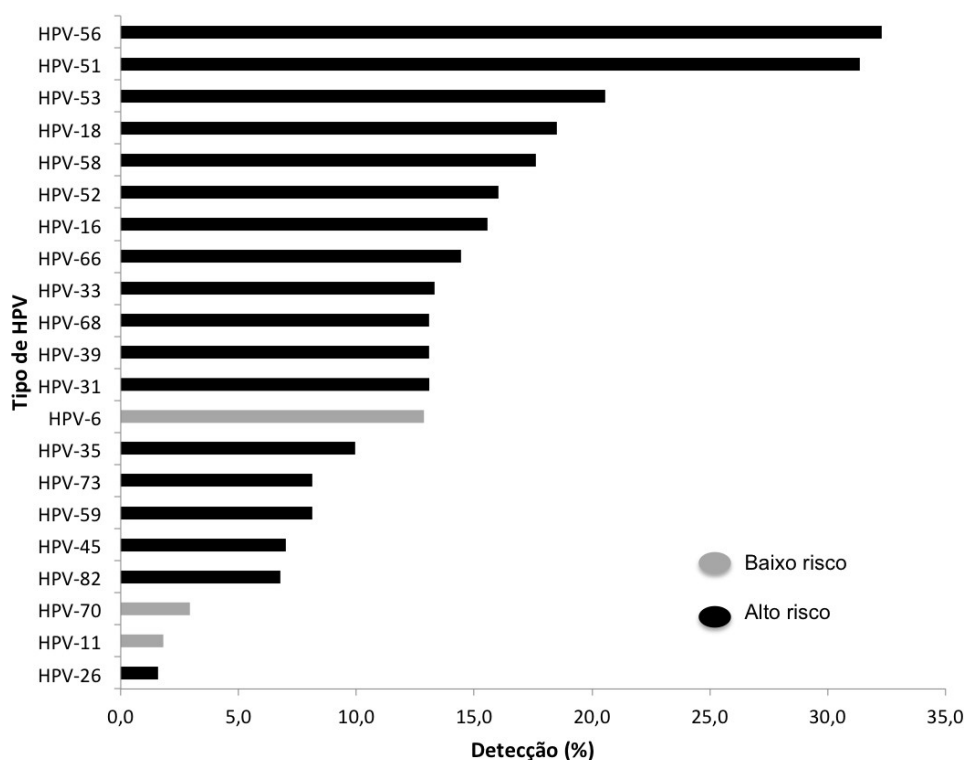


Figura 21 – Distribuição geral dos genótipos de HPV detectados nas amostras cérvico-vaginais. Os diferentes genótipos estão marcados no eixo “Y”, enquanto que a frequência dos casos (apresentado em porcentagem) está no eixo “X”.

Quando analisamos os resultados da tipagem separadamente (Figura 23), temos uma configuração ligeiramente diferente, entretanto, os tipos HPV-56 e HPV-51 permanecem entre os mais prevalentes.

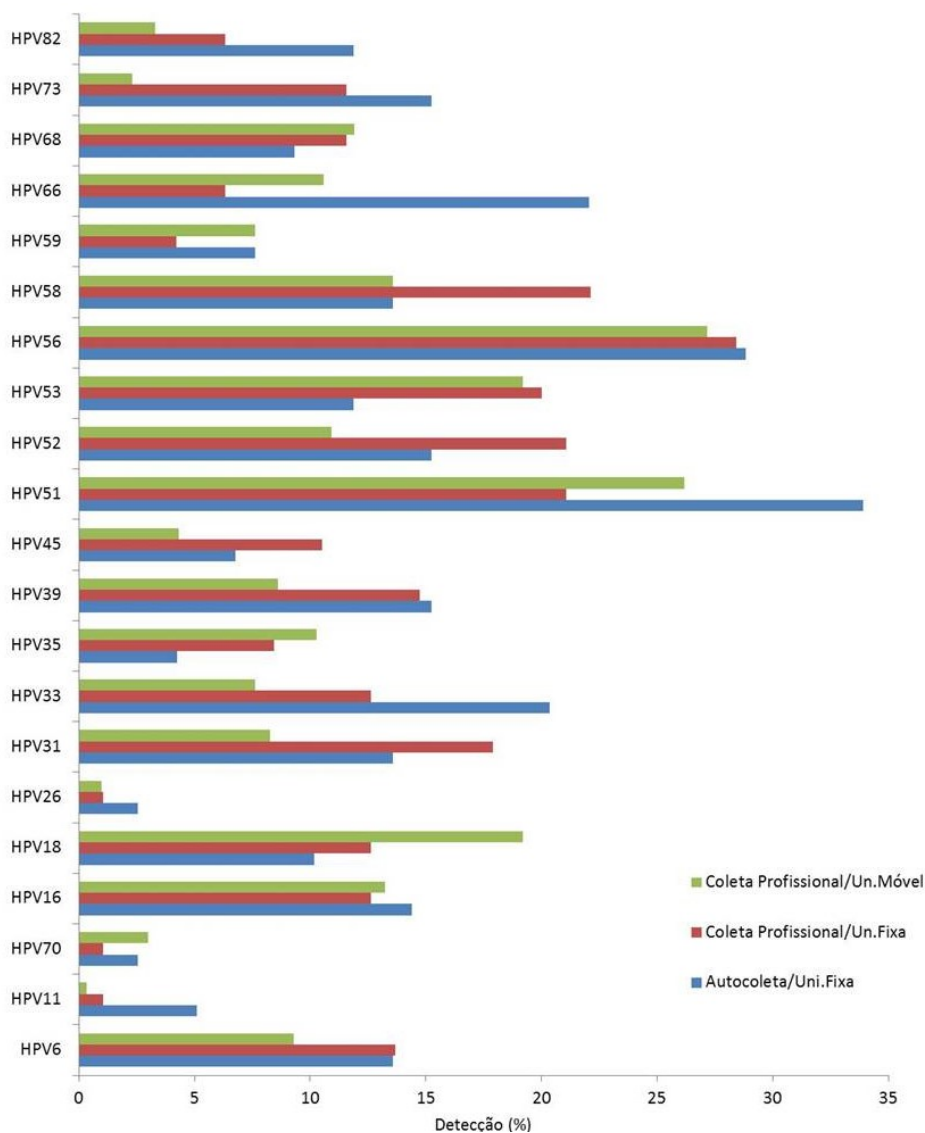


Figura 22 – Distribuição do genótipo de infecção genital por HPV, de acordo com o grupo e a unidade de coleta. Os diferentes genótipos de HPV estão marcados no eixo “Y”, enquanto que a frequência dos casos (apresentado em porcentagem) está no eixo “X”.

Na unidade fixa, os três casos encontrados com resultados positivo para o teste de HPV de alto risco e com lesão de alto grau na citologia, a infecção por hr-HPV foi confirmada

pela genotipagem (com múltipla infecção). No grupo das unidades móveis, os 15 casos de citologia HSIL e teste de hr-HPV positivo foram genotipados, sendo dois casos negativos, um inadequado e outro identificado com infecção por HPV de alto e baixo risco. Os demais foram positivos para HPV de alto risco, e a maioria com múltipla infecção.

7 DISCUSSÃO

Os resultados observados neste estudo mostram claramente que o teste *careHPV™* é factível de ser executado em condições adversas de comodidade e grandes complexidades laboratoriais. Na população estudada, foi observada uma positividade geral de 10,6% para HPV de alto risco; e 11,5% e 10% das amostras cérvico-vaginais, avaliadas nas unidades fixa e móveis, respectivamente. Dados consistentes com outros estudos brasileiros que demonstraram positividade de 9,7% a 10,5% de prevalência^{86, 87-89}. Entretanto, nossos achados foram ligeiramente inferiores aos encontrados em estudos prévios, com uma prevalência de 13 a 15%^{21, 23, 90}. Porém, nosso grupo de mulheres, não representa necessariamente, a população rural e remota do País.

Os testes de HPV baseados em DNA (como o *careHPV™*) ou RNA têm sido indicados para o rastreio de mulheres com risco de câncer cervical, devido à alta sensibilidade, baixa subjetividade, simplicidade e melhor reprodutibilidade, exercendo vantagens significativas quando comparados à citologia. Dessa forma, o teste de HPV DNA pode melhorar a detecção das lesões precursoras do câncer cervical^{12, 65, 78, 91, 12, 72, 85, 92}. Nesse contexto, procuramos avaliar um teste simples e confiável, para exames de auto coleta ou não, na tentativa de verificar o potencial do mesmo para ser utilizado em áreas remotas e de poucos recursos no Brasil. Uma vez que esta metodologia permite as duas formas de coleta (vaginal ou cervical), oferecendo uma maior flexibilidade, viabilidade e aceitação da mulher para realizar o teste, podendo então, abranger um maior número da população feminina. Em nosso estudo, o teste *careHPV™* demonstrou uma alta performance em detectar lesões de alto grau, visto que os 15 casos da série de amostras das unidades móveis foram positivos para este teste, e apenas duas mulheres na unidade fixa, com citologia alterada de alto grau, foram negativas para o teste de HPV. Nestes dois casos, a colposcopia foi insatisfatória e normal, com diagnóstico na biópsia de NIC1 e NIC3. Nas diferentes estratégias elaboradas, o teste molecular teve performance melhor que o teste de Papanicolaou isolado, superando nossas expectativas em identificar lesões de alto grau. O fato do teste *careHPV™* ter sido desenvolvido para locais de baixa renda e áreas remotas, e apresentar uma alta sensibilidade na identificação de mulheres com lesões cervicais, nos encoraja a avaliar a

implantação de testes moleculares de HPV como “*easy to perform*” nos programas de rastreio do câncer cervical em locais pouco desenvolvidos.

A infecção por HPV em mulheres jovens em sua maioria é transitória. Por outro lado, a persistência do HPV de alto risco em mulheres acima dos 40 anos de idade está associada ao desenvolvimento do câncer cervical, uma das principais causas de mortes por câncer entre mulheres brasileiras^{2, 93}. Nesse contexto, o teste de HPV DNA serviria para otimizar o rastreio primário de lesões precursoras do carcinoma invasor de colo uterino em populações de mulheres acima dos 30 anos, e também em áreas de poucos recursos, conforme preconizado por estudos anteriores^{94, 95, 12, 96}. Ao criarmos um *cutoff* entre o número total de mulheres participantes do estudo, com idade inferior ou superior a 30 anos, observamos que 89,3% (4.511/5.052) delas pertencem ao grupo de mulheres acima dos 30 anos. Esse grupo de mulheres com mais de 30 anos representa 73,3% (393/536) das amostras infectadas, bem como a maioria das mulheres que obtiveram lesões de alto grau comprovadas por colposcopia e biópsia.

Referente aos dados citológicos da população geral de estudo, 8,8% (427/4.841) das mulheres sem malignidade (NILM) e 36,7% (33/90) das mulheres ASC-US+ apresentaram resultado positivo no teste de HPV. Nos casos com citologia alterada, 39,3% (11/28) daquelas com citologia de ASC/AGC-H, 66,7% (47/71) daquelas que apresentaram citologia alterada de neoplasia intraepitelial de baixo grau (LSIL), 90% (18/20) das participantes com neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (HSIL) foram positivas no teste molecular de hr-HPV. Dados compatíveis com estudos realizados no Brasil⁹⁷⁻¹⁰⁰. Entretanto, dentre as mulheres convocadas para exame colposcópico, pouco mais da metade delas compareceu ao exame complementar. Alguns *guidelines* recomendam *follow-up* para mulheres com citologia ASC/AGC-US e teste de HPV negativo^{101, 102}. Esta é uma das limitações do presente estudo, uma vez que o grupo de mulheres com citologia de normal (NILM) a ASC/AGC-US e teste de hr-HPV negativo não foram convocadas para colposcopia e não realizaram biópsias, e dessa forma, pode-se dizer que não seria possível determinar a sensibilidade do teste. Em um estudo canadense foi encontrado 0,6% dos casos NIC2+ em mulheres com citologia e teste de HPV ambos negativos⁷⁷. Em nosso estudo, esse grupo representa cerca de 89% das mulheres participantes. Se ajustarmos os dados obtidos, inserindo um método de *bias* de verificação, a sensibilidade do teste estaria superestimada e a especificidade, subestimada.

Em relação ao grupo total das participantes convocadas para seguimento, houve uma taxa de 53,3% (308/578) de abstenção para o exame de colposcopia e/ou biópsia, correspondente a 35,1% (86/245) e 66,7% (222/333) nas unidades fixa e móvel, respectivamente. O tempo de espera entre o teste de HPV e a colposcopia foi em média de 228,4 dias para realização do exame, com um intervalo de tempo variando entre 3 e 497 dias. Saayman et al (2013)¹⁰³ e Meevasana (2014)¹⁰⁴ demonstraram que a correlação entre o diagnóstico final, citologia e colposcopia, não difere significativamente em relação ao intervalo de tempo, seja realizado antes ou depois de 180 dias. Algumas lesões invasivas podem ser detectadas pelo teste de HPV quando perdidas na citologia. O teste molecular tem diversas aplicações, incluindo o auxílio em diagnósticos incertos de mulheres que precisam ser encaminhadas para colposcopia. Fakokunde et al (2008)¹⁰⁵ observaram que mulheres com colposcopia realizada após 6 meses tinham menos tendência a tratamentos ou desenvolver lesões quando comparadas aos grupos examinados em um intervalo menor. Nosso estudo demonstrou que a citologia e o teste de HPV juntos, melhoram a especificidade dos resultados e a probabilidade de detectar lesões severas induzidas por HPV. Dentre as mulheres que foram biopsiadas, encontramos o diagnóstico final sem atipias ou com NIC1, NIC2+ e CEC/Carcinoma invasor em 82,7%; 13,2% e 2,8%, respectivamente. Dados relativamente similares ao encontrado por Meevasana et al (2014)¹⁰⁴, que descreveram ter obtido diagnósticos de 73,70%; 24,78% e 1,52% nos mesmos grupos descritos acima.

A discordância entre o exame de Papanicolaou e a colposcopia pode resultar em um diagnóstico mais ou menos agressivo do que quando comparados à diferença entre colposcopia e a biópsia. O intervalo de tempo entre a citologia e a colposcopia pode variar na prática, especialmente porque em diversos países, como no Brasil, os exames de colposcopia são limitados ou sobrecarregados no sistema de saúde pública^{63, 103}. Ao considerarmos os casos de lesão intraepitelial cervical, elas podem regredir (baixo grau) ou evoluir (alto grau) durante o intervalo de tempo para realização do exame de colposcopia. E este tempo, pode ocasionar na paciente um estado de ansiedade maior pelo fato de ter conhecimento sobre a alteração citológica em seu exame preventivo, bem como pelo estresse em realizar a colposcopia^{104, 106}.

Encontramos nos quatro modelos de interpretação das performances dos testes variações bastante interessantes de serem analisadas devido às diferenças nas estratégias avaliadas. Independentemente das análises propostas, o teste de HPV e citologia, quando combinados, oferecem alta sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo (VPN), mas reduzido valor preditivo positivo (VPP). Mesmo isoladamente, o VPP é significativamente baixo, inferior a 50%, o que parece limitar os testes moleculares disponíveis e as qualidades relacionadas à baixa frequência de teste falso-negativo, o que não é mal cenário se considerarmos que a baixa sensibilidade é uma das principais fraquezas do exame citológico, mas certamente, é um parâmetro que vai requerer mais indicações aos exames colposcópicos.

O desempenho do teste *careHPV™* tem sido avaliado em diversos estudos, apresentando uma sensibilidade alta ao considerarmos a simplicidade de execução, porém uma especificidade menor quando comparado à citologia de base líquida e à inspeção visual com ácido acético (VIA) para detectar lesões intraepiteliais de alto grau (NIC 2+)^{12, 21-24}. Essa menor especificidade pode ser explicada pelo fato da presença do HPV de alto risco não estar, necessariamente, associada às lesões de alto grau⁷⁸.

Diversas pesquisas têm confirmado que o teste de HPV tem apresentado desempenho superior à citologia como método primário de rastreamento, para detectar lesões NIC2+ (neoplasia intraepitelial cervical 2 ou mais) reduzindo assim, a incidência e a mortalidade da doença^{12, 81, 82}. Relativo à performance diagnóstica do *careHPV™* em nosso estudo, a premissa de detecção de lesões de alto grau foi corroborada, mostrando que o teste molecular apresentou dados semelhantes ou melhores em sensibilidade e valores preditivos negativo e positivo dentre as diferentes estratégias adotadas. Estudos que avaliaram a mesma metodologia encontraram uma variação na sensibilidade do teste de 81,4% a 83,8% em auto coleta e de 84,2% a 97% em coleta profissional, entre amostras com lesão NIC2+ ou NIC3+^{12,21}. A acurácia do teste *careHPV™* foi calculada pela área sob curva ROC (apresentadas nas figuras 18 a 20), e demonstrou claramente vantagens sobre as estratégias de screening propostas. E, mesmo quanto à especificidade, tradicionalmente melhor para a citologia, o teste *careHPV™* teve desempenho considerável, e dentre as opções apresentadas, o GS1 foi o que demonstrou resultados mais próximos à nossa realidade. E os demais, foram estratégias extrapoladas. O fato de a especificidade ser notavelmente menor

nas amostras realizadas por auto coleta, pode ocorrer pelo fato de a mulher não conseguir chegar à região do colo do útero com o dispositivo utilizado, como descrito em alguns estudos anteriores^{12, 21, 107}.

Os índices de desempenho confirmam claramente a eficiência do teste em detectar lesões de alto grau, com notável especificidade e sensibilidade e valores preditivos negativos, seja o teste isolado ou associado à citologia⁷⁷. A acurácia do teste *careHPV™* demonstrou vantagens nas estratégias propostas. Em geral, cerca de 2 a 5% das mulheres submetidas aos programas de rastreio do câncer cervical possuem classificação citológica de ASC-US. Uma boa parte destes resultados evolui para uma lesão de baixo grau (LSIL)^{102, 108}.

Na avaliação do questionário aplicado, os achados sociodemográficos não demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre a positividade para hr-HPV e o uso de tabaco, número de filhos, parceiros sexuais e uso de anticoncepcional na população analisada. Esses dados nos mostram também que o sistema de randomização utilizado na unidade fixa foi realizado de forma adequada.

Em relação à genotipagem realizada nas amostras positivas para o teste molecular, utilizando o próprio material do *careHPV™*, a prevalência foi dos tipos HPV-56, HPV-51, HPV-53, HPV-18, HPV-58, HPV-52 e HPV-16, com detecção em 32,3%, 31,4%, 20,5%, 18,5%, 17,6%, 16,0% e 15,6%, respectivamente. Estudos Canadenses demonstraram uma detecção de 1 a 7% do HPV-56 em pacientes NIC2 e NIC3^{109, 110}. Em um estudo retrospectivo realizado na Bahia, cerca de 14% das mulheres com lesão de alto grau e 18% com lesão de baixo grau foram identificadas com infecção por HPV-16 e HPV-56¹¹¹. Esses dados diferem substancialmente da maioria dos estudos disponíveis que colocam o HPV-16 e HPV-18 como os mais prevalentes na população geral¹¹²⁻¹¹⁴. Essas prevalências podem ser computadas às diferenças possíveis de serem observadas regionalmente, ou mesmo às limitações das tecnologias utilizadas para identificação de HPV. Entretanto, alguns estudos demonstraram a prevalência dos tipos HPV-52, HPV-56 e HPV-58 em associação com lesões NIC2+^{115, 116}. Assim como, a possibilidade de que esses tipos seriam mais comumente encontrados em países em desenvolvimento¹¹⁷.

Para que a rotina com *careHPV™* nas unidades móveis do Hospital de Câncer de Barretos fosse totalmente aplicável, seria necessária a presença de um médico-colposcopista nas unidades em que o equipamento estivesse instalado, a rotina de visita nas cidades

deveria ser em tempo suficiente para a análise do material coletado, para que tornasse possível assistir adequadamente, àquelas mulheres em que a infecção é presente, realizando de forma verdadeira, a proposta "detectar e tratar".

8 CONCLUSÕES

8.1 Geral

O teste molecular *careHPV™* apresentou uma alta performance diagnóstica para detecção de HPV e, uma correlação diagnóstica notável de 90% dos testes positivos nas lesões de alto grau, comprovadas histopatologicamente.

8.2 Específicas

- i. Os exames coletados por profissional de saúde e os obtidos por auto coleta, apresentaram valores similares de positividade para HPV de alto risco, com 10,1% e 13,0%, respectivamente;
- ii. Considerando ambas as unidades de coleta, o desempenho do teste *careHPV™* foi bastante significativo, pois a maioria das mulheres sem infecção por hr-HPV foram classificadas como livres de lesão cervical pela citologia (NILM). Dentre as mulheres hr-HPV positivas convocadas e submetidas à biópsia, 16% delas foi diagnosticada com lesão NIC2+;
- iii. Considerando os três cenários de coleta, os dez tipos de HPV genotipados mais comuns foram semelhantes; porém diferente quanto à frequência, com predomínio do HPV-56 nas coletas por profissional de saúde e HPV-51 na auto coleta.

REFERÊNCIAS

1. IARC. *Cervical Cancer - Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. [Internet]: International Agency for Research on Cancer; 2012; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. INCA. *Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional*. [database on the Internet]. 2014. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>.
3. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. *Global burden of human papillomavirus and related diseases*. **Vaccine**. 2012;30 Suppl 5:F12-23.
4. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. *The biology and life-cycle of human papillomaviruses*. **Vaccine**. 2012;30 Suppl 5:F55-70.
5. Zhao FH, Tiggelaar SM, Hu SY, Xu LN, Hong Y, Niyazi M, et al. *A multi-center survey of age of sexual debut and sexual behavior in Chinese women: suggestions for optimal age of human papillomavirus vaccination in China*. **Cancer Epidemiol**. 2012;36(4):384-90.
6. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, et al. *Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis*. **Int J Cancer**. 2013;133(6):1271-85.
7. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. *Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer*. **Vaccine**. 2012;30 Suppl 5:F88-99.
8. Paengchit K, Kietpeerakool C, Wangchai W, Pouraeng S, Lalitwongsa S. *Cervical pathology in cytology-negative/HPV-positive women: results from Lampang Cancer Hospital, Thailand*. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(18):7951-4.
9. Schiffman M, Burk RD, Boyle S, Raine-Bennett T, Katki HA, Gage JC, et al. *A study of genotyping for management of human papillomavirus-positive, cytology-negative cervical screening results*. **J Clin Microbiol**. 2015;53(1):52-9.
10. Castle PE, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Wentzensen N, Gage JC, et al. *Clinical human papillomavirus detection forecasts cervical cancer risk in women over 18 years of follow-up*. **J Clin Oncol**. 2012;30(25):3044-50.
11. Lin CQ, Chen F, Liu B, Zhang YZ, Cui XL, Li AM, et al. *A parallel study of careHPV and Hybrid Capture 2 human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in rural China*. **J Virol Methods**. 2014;202:73-8.
12. Qiao YL, Sellors JW, Eder PS, Bao YP, Lim JM, Zhao FH, et al. *A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China*. **Lancet Oncol**. 2008;9(10):929-36.

13. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, 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.* **CA Cancer J Clin.** 2012;62(3):147-72.
14. Moyer VA, Force USPST. *Screening for cervical cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement.* **Ann Intern Med.** 2012;156(12):880-91, W312.
15. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. *Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test.* **Gynecol Oncol.** 2015;136(2):189-97.
16. Castle PE, de Sanjosé S, Qiao YL, Belinson JL, Lazcano-Ponce E, Kinney W. *Introduction of human papillomavirus DNA screening in the world: 15 years of experience.* **Vaccine.** 2012;30 Suppl 5:F117-22.
17. Jeronimo J, Bansil P, Valdez M, Kang LN, Zhao FH, Qiao YL, et al. *The Influence of Human Papillomavirus Genotypes on Visual Screening and Diagnosis of Cervical Precancer and Cancer.* **J Low Genit Tract Dis.** 2014.
18. Campos NG, Burger EA, Sy S, Sharma M, Schiffman M, Rodriguez AC, et al. *An updated natural history model of cervical cancer: derivation of model parameters.* **Am J Epidemiol.** 2014;180(5):545-55.
19. Lorenzi AT, Fregnani JH, Possati-Resende JC, Neto CS, Villa LL, Longatto-Filho A. *Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test.* **Gynecol Oncol.** 2013;131(1):131-4.
20. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. *Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses.* **Vaccine.** 2012;30 Suppl 5:F100-6.
21. Qiao YL, Jeronimo J, Zhao FH, Schweizer J, Chen W, Valdez M, et al. *Lower cost strategies for triage of human papillomavirus DNA-positive women.* **Int J Cancer.** 2014;134(12):2891-901.
22. Zhao FH, Jeronimo J, Qiao YL, Schweizer J, Chen W, Valdez M, et al. *An evaluation of novel, lower-cost molecular screening tests for human papillomavirus in rural China.* **Cancer Prev Res (Phila).** 2013;6(9):938-48.
23. Chen W, Jeronimo J, Zhao FH, Qiao YL, Valdez M, Zhang X, et al. *The concordance of HPV DNA detection by Hybrid Capture 2 and careHPV on clinician- and self-collected specimens.* **J Clin Virol.** 2014;61(4):553-7.
24. Kang LN, Jeronimo J, Qiao YL, Zhao FH, Chen W, Valdez M, et al. *Optimal positive cutoff points for careHPV testing of clinician- and self-collected specimens in primary cervical cancer screening: an analysis from rural China.* **J Clin Microbiol.** 2014;52(6):1954-61.
25. IARC. *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.* [Internet]: International Agency for Research on Cancer; 2012 [updated 15/08/2013]; Available from: <http://www.globocan.iarc.fr>.

26. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. **Virology**. 2010;401(1):70-9.
27. Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, et al. *Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages*. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**. 2011;20(3):113-23.
28. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. *Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer*. **J Natl Cancer Inst**. 2011;103(5):368-83.
29. Doorbar J. *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. **Clin Sci (Lond)**. 2006;110(5):525-41.
30. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. *A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012;109(26):10516-21.
31. Gross G, Tying SK. *Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases*: Springer Heidelberg; 2011. 925 p.
32. IARC. *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner's Manual*. [Internet] France: International Agency for Research on Cancer; 2003.
33. Rijkaart D. *Impact of HPV testing on cervical cancer screening*. Amsterdam, Netherlands: VU University Medical Center; 2013.
34. Alves VA, Castelo A, Filho AL, Vianna MR, Taromaru E, Namiyama G, et al. *Performance of the DNA-Citoliq liquid-based cytology system compared with conventional smears*. **Cytopathology**. 2006;17(2):86-93.
35. Nayar R, Wilbur DC. *The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated."* (after a quotation from Mark Twain). **Acta Cytol**. 2015;59(2):121-32.
36. Kulmala S-M. *Human Papillomavirus (HPV) Related Risk Factors in Cervical Cancer Development*.: University of Turku; 2007.
37. Louvanto K, Rautava J, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S. *The clearance of oral high-risk human papillomavirus infection is impaired by long-term persistence of cervical human papillomavirus infection*. **Clin Microbiol Infect**. 2014;20(11):1167-72.
38. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. **Vaccine**. 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
39. Coelho FRGF, J.Fregnani J.H.T.G. Zeferino, L.C.Villa, L.L.Federico, M.H.Novaes, P.E.R.S.Costa, R.L.R. *Câncer do Colo do Útero*.2008. 660 p.

40. Wiley D, Masongsong E. *Human papillomavirus: the burden of infection*. **Obstet Gynecol Surv**. 2006;61(6 Suppl 1):S3-14.
41. Paavonen J. *Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias*. **Int J Infect Dis**. 2007;11 Suppl 2:S3-9.
42. Schiffman M. *Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing*. **Cancer**. 2007;111(3):145-53.
43. Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, et al. *High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology*. **BMC Cancer**. 2011;11:473.
44. Diaz ML. *Counseling the patient with HPV disease*. **Obstet Gynecol Clin North Am**. 2013;40(2):391-402.
45. Sakakibara N, Chen D, McBride AA. *Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells*. **PLoS Pathog**. 2013;9(7):e1003321.
46. Lorenzi AT, Syrjanen KJ, Longatto-Filho A. *Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective*. **Viol J**. 2015;12:112.
47. Banks L, Pim D, Thomas M. *Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2012;12(12):877-86.
48. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. *Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases*. **Vaccine**. 2013;31 Suppl 7:H1-31.
49. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. **Vaccine**. 2006;24 Suppl 3:S3/42-51.
50. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. *Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries*. **Vaccine**. 2008;26 Suppl 10:K29-41.
51. Gravitt PE. *The known unknowns of HPV natural history*. **J Clin Invest**. 2011;121(12):4593-9.
52. Stanley M. *Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination*. **Gynecol Oncol**. 2007;107(2 Suppl 1):S19-23.
53. Koskimaa HM, Waterboer T, Pawlita M, Grénman S, Syrjänen K, Syrjänen S. *Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes*. **J Pediatr**. 2012;160(5):837-43.
54. Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Malila N, Tarkkanen J, Laurila P, et al. *Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting*. **J Natl Cancer Inst**. 2009;101(23):1612-23.

55. Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K, Mulherkar R. *HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women*. **PLoS One**. 2012;7(7):e41012.
56. Villa LL. *Biology of genital human papillomaviruses*. **INT J GYNECOLOGY & OBSTETRICS**. 2006;94:S3-S7.
57. Kajitani N, Satsuka A, Yoshida S, Sakai H. *HPV18 E1^{E4} is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins*. **Front Microbiol**. 2013;4:251.
58. D'Abramo CM, Archambault J. *Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions*. **Open Virol J**. 2011;5:80-95.
59. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. *A review of methods for detect human Papillomavirus infection*. **Virol J**. 2012;9:262.
60. Oh Y, Bae SM, Kim YW, Choi HS, Nam GH, Han SJ, et al. *Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types*. **Cancer Sci**. 2007;98(4):549-54.
61. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, 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.
62. Franco EL, Cuzick J. *Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination*. **Vaccine**. 2008;26 Suppl 1:A16-23.
63. INCA. *Diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer de colo do útero*. [Internet] Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2011; Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_uterio.pdf.
64. Lazcano-Ponce E, Lörincz AT, Salmerón J, Fernández I, Cruz A, Hernández P, et al. *A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program*. **Cancer Causes Control**. 2010;21(10):1693-700.
65. Longatto-Filho A, Schmitt FC. *Gynecological cytology: too old to be a pop star but too young to die*. **Diagn Cytopathol**. 2007;35(10):672-3.
66. Castle PE, Schmeler KM. *HPV vaccination: for women of all ages?* **Lancet**. 2014;384(9961):2178-80.
67. Cox T, Cuzick J. *HPV DNA testing in cervical cancer screening: from evidence to policies*. **Gynecol Oncol**. 2006;103(1):8-11.
68. Saúde SdEd. *Informe Técnico - Vacina contra o papilomavírus humano (HPV)*. São Paulo: COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS; 2014.

69. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. *Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening.* **Int J Cancer.** 2006;119(5):1095-101.
70. Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenck U, Baldauf JJ, Da Silva D, et al. *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1.* **Cytopathology.** 2008;19(6):342-54.
71. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. *Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution.* **Obstet Gynecol Clin North Am.** 2007;34(4):739-60, ix.
72. Schmitt FC, Longatto-Filho A, Valent A, Vielh P. *Molecular techniques in cytopathology practice.* **J Clin Pathol.** 2008;61(3):258-67.
73. Gibb RK, Martens MG. *The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer.* **Rev Obstet Gynecol.** 2011;4(Suppl 1):S2-S11.
74. Karnon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. *Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis.* **Health Technol Assess.** 2004;8(20):iii, 1-78.
75. Lowy DR, Solomon D, Hildesheim A, Schiller JT, Schiffman M. *Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer.* **Cancer.** 2008;113(7 Suppl):1980-93.
76. Trottier H, Franco EL. *Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention.* **Am J Manag Care.** 2006;12(17 Suppl):S462-72.
77. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer.* **N Engl J Med.** 2007;357(16):1579-88.
78. Zhao FH, Lewkowitz AK, Chen F, Lin MJ, Hu SY, Zhang X, et al. *Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method.* **J Natl Cancer Inst.** 2012;104(3):178-88.
79. Zhao FH, Lin MJ, Chen F, Hu SY, Zhang R, Belinson JL, et al. *Performance of high-risk human papillomavirus DNA testing as a primary screen for cervical cancer: a pooled analysis of individual patient data from 17 population-based studies from China.* **Lancet Oncol.** 2010;11(12):1160-71.
80. Holanda F, Castelo A, Veras TM, de Almeida FM, Lins MZ, Dores GB. *Primary screening for cervical cancer through self sampling.* **Int J Gynaecol Obstet.** 2006;95(2):179-84.
81. Mullins R, Scalzo K, Sultana F. *Self-sampling for cervical screening: could it overcome some of the barriers to the Pap test?* **J Med Screen.** 2014;21(4):201-6.
82. Lazcano-Ponce E, Lorincz AT, Cruz-Valdez A, Salmerón J, Uribe P, Velasco-Mondragón E, et al. *Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial.* **Lancet.** 2011;378(9806):1868-73.

83. Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, Tramèr MR, Franco EL, Coutlée F. *Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis.* **Gynecol Oncol.** 2007;105(2):530-5.
84. Petignat P, Vassilakos P. *Is it time to introduce HPV self-sampling for primary cervical cancer screening?* **J Natl Cancer Inst.** 2012;104(3):166-7.
85. Qiagen. *The careHPV test training guide.*: **Qiagen Corporation**; 2008.
86. 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 Journal of Obstetrics and Gynecology.** 2014;04(08):470-8.
87. de Aguiar SR, Villanova FE, Martins LC, dos Santos MS, Maciel JeP, Falcão LF, et al. *Human papillomavirus: prevalence and factors associated in women prisoners population from the Eastern Brazilian Amazon.* **J Med Virol.** 2014;86(9):1528-33.
88. 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.
89. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. *[Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women].* **Rev Saude Publica.** 2002;36(1):95-100.
90. Kang LN, Castle PE, Zhao FH, Jeronimo J, Chen F, Bansil P, et al. *A prospective study of age trends of high-risk human papillomavirus infection in rural China.* **BMC Infect Dis.** 2014;14:96.
91. Dijkstra MG, van Niekerk D, Rijkaart DC, van Kemenade FJ, Heideman DA, Snijders PJ, et al. *Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: how to manage screen-positive women? A POBASCAM trial substudy.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2014;23(1):55-63.
92. Labani S, Asthana S. *Human papillomavirus viral load on careHPV testing of self-collected vaginal samples vs. clinician-collected cervical samples.* **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2014;181:233-9.
93. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women.* **N Engl J Med.** 1998;338(7):423-8.
94. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. *Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials.* **Lancet.** 2014;383(9916):524-32.
95. Meijer CJ, Rijkaart DC, Berkhof J, Snijders PJ, Petry KU, Arbyn M. *HPV-Based Cervical Cancer Screening.* In: ESGO, editor. *TextBook of Gynaecological Oncology.* 2nd ed 2011.
96. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. *HPV screening for cervical cancer in rural India.* **N Engl J Med.** 2009;360(14):1385-94.

97. Fernandes JV, Meissner ReV, de Carvalho MG, Fernandes TA, de Azevedo PR, Villa LL. *Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil*. **Int J Gynaecol Obstet**. 2009;105(1):21-4.
98. Becker E, Edelweiss MI, Nonnenmacher B, Bozzetti MC. *Prevalence and epidemiologic correlates of atypical squamous cells of undetermined significance in women at low risk for cervical cancer*. **Diagn Cytopathol**. 2001;24(4):276-82.
99. Noronha VL, Cruz EM, Pinho CN, Mello WA, Villa LL, Russomano FB. *Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Submetidas a Rastreamento para Câncer de Cérvix Uterina, Belém – Pará – Brasil*. **DST - J bras Doenças Sex Transm**. 2011;23.
100. Entiauspe LG, Silveira M, Nunes EM, Basgalupp SP, Stauffert D, Dellagostin OA, et al. *High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil*. **Braz J Microbiol**. 2014;45(2):689-94.
101. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, 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*. **CA Cancer J Clin**. 2012;62(3):147-72.
102. Gage JC, Katki HA, Schiffman M, Castle PE, Fetterman B, Poitras NE, et al. *The low risk of precancer after a screening result of human papillomavirus-negative/atypical squamous cells of undetermined significance papanicolaou and implications for clinical management*. **Cancer Cytopathol**. 2014;122(11):842-50.
103. Saayman F, Van Gelderen CJ, Michelow P, Van Den Berg EJ, Adam Y. *Effect of 2 referral intervals on diagnostic discordance between cytology and histology at a colposcopy clinic*. **Int J Gynaecol Obstet**. 2013;120(3):257-61.
104. Meevasana V, Suwannarurk K, Chanthasenanont A, Tanprasertkul C, Bhamarapratana K, Pattaraarchachai J. *Is the correlation between Papanicolaou smear and histopathology results affected by time to colposcopy?* **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(4):1527-30.
105. Fakokunde B, Selo-Ojeme D. *Impact of prolonged referral interval on colposcopic outcomes in women with moderate or severe dysplasia*. **Int J Gynaecol Obstet**. 2008;101(3):245-7.
106. Tahseen S, Reid PC. *Psychological distress associated with colposcopy: patients' perception*. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2008;139(1):90-4.
107. Ogilvie GS, Patrick DM, Schulzer M, Sellors JW, Petric M, Chambers K, et al. *Diagnostic accuracy of self collected vaginal specimens for human papillomavirus compared to clinician collected human papillomavirus specimens: a meta-analysis*. **Sex Transm Infect**. 2005;81(3):207-12.
108. Who. *Comprehensive Cervical Cancer Control - A guide to essential practice*. **World Health Organization**; 2014.

109. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. *Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update*. **Int J Cancer**. 2007;121(3):621-32.
110. Coutlee F, Ratnam S, Ramanakumar AV, Insinga RR, Bentley J, Escott N, et al. *Distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Canada*. **J Med Virol**. 2011;83(6):1034-41.
111. Bruno A, Serravalle K, Travassos AG, Lima BGdC. *Distribuição dos genótipos de papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil*. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 2014;36(9):416-22.
112. Ramakrishnan S, Patricia S, Mathan G. *Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: pathogenesis to prevention*. **Biomed Pharmacother**. 2015;70:103-10.
113. Wright TC, Jr., Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, et al. *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.
114. Tamegão-Lopes BP, Sousa-Júnior EC, Passetti F, Ferreira CG, de Mello WA, Duarte Silvestre RV. *Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil*. **Infect Agent Cancer**. 2014;9:25.
115. Ma L, Cong X, Bian M, Shi M, Wang X, Liu J, et al. *[High-risk HPV genotyping PCR testing as a means of cervical cancer and precancerous lesions early screening]*. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**. 2015;50(4):246-52.
116. Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS. *The clinical performance of primary HPV screening, primary HPV screening plus cytology cotesting, and cytology alone at a tertiary care hospital*. **Cancer Cytopathol**. 2015.
117. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. *Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world*. **Arch Gynecol Obstet**. 2012;285(3):771-7.

ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO²

TÍTULO DO ESTUDO: *careHPV™* – Teste de Captura Híbrida em Unidade Móvel para Melhoria do Programa de Rastreamento do Câncer Cervical em Áreas Rurais e Remotas Brasileiras

Pesquisadores Responsáveis: Adriana T. Lorenzi e Adhemar Longatto Filho. Local: Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII e Unidades Móveis da Instituição.

EXPLICAÇÃO DO ESTUDO: Você está sendo convidada para esse estudo que fará um exame que poderá diagnosticar se você tem ou não o vírus do HPV (Papilomavirus humano). Este vírus é transmitido através da relação sexual, pode infectar os órgãos genitais e provocar, em alguns casos, câncer de colo uterino. Para saber se você tem ou não o vírus, realizaremos um exame, parecido com o Papanicolaou (exame preventivo). Dessa forma, conseguiremos encontrar as mulheres infectadas antes que aconteça o câncer. Se você aceitar participar do estudo e assinar esse documento, será coletada uma amostra da secreção do seu colo uterino através de uma pequena escova específica para o estudo. Após esta coleta, será realizado o exame de Papanicolaou como de costume, que irá nos ajudar a concluir o diagnóstico. Use o tempo que for necessário para decidir se você quer ou não participar deste estudo. O médico do estudo e a equipe conversarão com você sobre a não participação neste estudo, se for o caso. **OBJETIVO DO ESTUDO:** testar um novo equipamento (chamado *careHPV™*) cujo funcionamento é bastante conhecido pelos médicos há vários anos, chamado Captura Híbrida, mas que identifica o HPV de forma mais simples e rápida. **PROCEDIMENTOS:** cerca de 5 mil mulheres participarão do estudo e farão os dois tipos de exame (*careHPV™* e Papanicolaou). Para participar do estudo você não pode ter tido relações sexuais (mesmo com camisinha), utilizado ducha ou medicamentos vaginais dois dias antes do exame. Também não pode estar menstruada, pois a presença de sangue pode alterar o resultado. Você será questionada se deseja ou não participar do estudo, e em caso positivo, responderá algumas questões sobre sua vida geral, sexual e ginecológica. Para realizar o exame, será coletada uma pequena quantidade da secreção do colo uterino, em sala privativa e/ou banheiro da sala de coleta, utilizando uma pequena escova que será introduzida na vagina. Haverá duas formas de coleta de amostras realizada no Ambulatório do Hospital de Câncer de Barretos: pela auto coleta e a coleta realizada pela profissional de saúde. No ambulatório, a escolha de qual forma será feita a coleta será através de um sorteio no momento da consulta. No caso da auto coleta, você será orientada pela profissional de saúde sobre a forma correta de introduzir a escova na vagina, até que não entre mais, girar a escova por 3 vezes, retirá-la e introduzi-la no frasco com líquido especial, e entregue à profissional de saúde. Nas Unidades Móveis, haverá apenas a coleta pela profissional de saúde. No caso da coleta ser feita pela profissional de saúde (que acontecerá no ambulatório e nas unidades móveis da instituição), essa profissional introduzirá a escova no canal vaginal até o colo uterino, girará a escova por 3 vezes, vai retirá-la e introduzi-la no frasco com líquido especial. Após este exame, como de costume, a mulher terá seu exame de Papanicolaou realizado pela profissional de saúde. **DESTINO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS:** O exame para pesquisa do HPV será realizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, e o exame de Papanicolaou será analisado pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Câncer de Barretos. Depois de todas as análises realizadas, e as informações deste termo obtidas, toda sobra de material será guardada no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular desta instituição e poderá ser utilizada em outros estudos científicos que envolvam análises de células do colo uterino. Caso o material venha a ser utilizado em outro estudo, uma nova autorização será solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. **DESCONFORTOS E RISCOS:** durante o exame poderá ocorrer algum desconforto como uma pressão na vagina, semelhante ao da coleta tradicional do Papanicolaou. Também poderá haver um sangramento muito pequeno, que logo cessará

Espaço para etiqueta
de identificação do
exame

espontaneamente. Se você sentir dor (o que não é comum), avise a profissional de saúde e ela interromperá o exame. **BENEFÍCIOS:** você poderá se beneficiar por participar deste estudo uma vez que se for identificado HPV você será avisada e acompanhada pela equipe médica do Hospital de Câncer de Barretos. Nosso objetivo é evitar que você desenvolva qualquer ferida grave no colo uterino que possa virar tumor. Outras mulheres também poderão se beneficiar por esse estudo se os resultados no final forem bons. A prevenção do câncer do colo uterino poderá melhorar caso este estudo mostre que o teste aplicado é eficiente para diagnosticar infecção por HPV e prevenir o desenvolvimento do câncer. **LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** a sua participação neste estudo é voluntária. Você pode aceitar participar do estudo e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital mesmo que o teste mostre a presença do HPV. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados deste estudo forem publicados em revistas científicas, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada para ninguém e em nenhum lugar. **ALTERNATIVAS:** você não precisa participar deste estudo para fazer exames de prevenção do câncer de colo de útero. Já existe o exame de Papanicolaou, que tem sido utilizado na rotina dos hospitais no Brasil. Se você não aceitar participar do estudo, você poderá fazer somente este exame de rotina. **INTERRUPÇÃO DO ESTUDO:** este estudo poderá ser interrompido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, que o aprovou, caso existam razões de segurança que exijam a interrupção imediata do estudo. **CUSTOS, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:** a participação neste estudo não terá custos para você. Todos os custos relacionados com o estudo serão pagos pelo Hospital de Câncer de Barretos e pela empresa Qiagen Brasil. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação. Se você sofrer algum dano como resultado da sua participação nesse estudo, o Hospital de Câncer de Barretos será responsável por lhe dar tratamento integral. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você não está perdendo nenhum direito, inclusive o de obter indenização por dano a sua saúde, caso isto venha acontecer. **ESCLARECIMENTOS ADICIONAIS, CRÍTICAS E RECLAMAÇÕES:** a qualquer momento você pode pedir novos esclarecimentos, fazer críticas e reclamações sobre este estudo através dos seguintes contatos: Pesquisador principal: Adhemar Longatto Filho – telefone (17) 3321-6600, ramal 7075. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos - telefone (17) 3321- 6600, ramal 6894.

AUTORIZAÇÃO DA PACIENTE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Depois de ter recebido explicações detalhadas e claras sobre o estudo e ter esclarecido todas as minhas dúvidas, EU, _____, decido que participarei deste estudo na condição de voluntária e concordo com o uso do material coletado do meu colo do útero para fins deste estudo científico e de outros que possam surgir no futuro nesta instituição. Estou ciente que receberei um TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO original assinado e datado, e outra via original será guardada nos arquivos do meu médico do estudo.

_____ Data: ____ / ____ / ____ Nome e
assinatura da voluntária ou representante legal

_____ Data: ____ / ____ / ____ Nome e assinatura
do responsável por explicar e obter este consentimento

Anexo B – Questionário aplicado na unidade fixa



Questionário Projeto careHPV – Amostras Ambulatório

Colar aqui a etiqueta
com número do exame

	SIM	NÃO	Quanto tempo?
É FUMANTE?			
FAZ USO DE CONTRACEPTIVO ORAL?			
NÚMERO FILHOS			
NÚMERO DE PARCEIROS AO LONGO DA VIDA			

Número do envelope retirado: careHPV™ _____

Nome da Paciente: _____

Anexo C – Questionário aplicado nas unidades móveis



Questionário Projeto careHPV – Amostras Unidades Móveis

Colar aqui a etiqueta
com número do exame.

QUESTÃO:	SIM	NÃO	
É FUMANTE?			
FAZ USO DE CONTRACEPTIVO ORAL?			
NÚMERO FILHOS			
NÚMERO DE PARCEIROS AO LONGO DA VIDA			

Nome da Paciente: _____

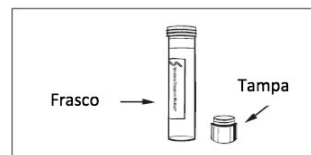
Anexo D – Material ilustrativo utilizado no grupo de auto coleta

PROCEDIMENTO DE AUTOCOLETA - AMBULATÓRIO

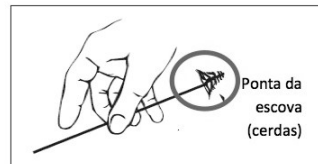
1. Lave bem as mãos com água e sabão antes de iniciar o procedimento.



2. Destampe o frasco e coloque a tampa com a parte interna para cima (como mostra a figura). Coloque o frasco em uma superfície lisa, próximo a você. **CUIDADO** para não derramar o líquido.



3. Com sua mão dominante (a mão que utiliza para escrever), segure a extremidade plástica da escova e deixe as cerdas (cabeça) da escova voltada para você. (Como na figura)

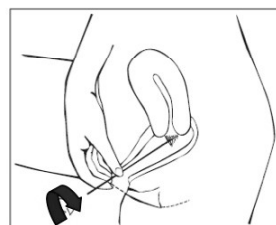


4. Com a outra mão, abra cuidadosamente a parte externa da vagina (como na figura) e insira cuidadosamente a ponta das cerdas da escova na abertura vaginal.



5. Segure a escova firme e reta. Introduza devagar a escova dentro da vagina, empurrando para dentro, naturalmente; sem forçar. Se não entrar facilmente, dê um giro na escova, de forma delicada, para a direita ou esquerda. Se sentir dor prolongada ou um maior desconforto, pare e fale com a técnica de enfermagem.

6. Continue introduzindo a escova até sentir que a escova não entra mais (resistência). Uma vez encontrada a resistência, segure suavemente a escova no local, gire-a em círculo completo (sem retirar a escova do local, como na figura), e repita o procedimento por 3 vezes. (Girar como se estivesse dando corda em um relógio).



7. Retire a escova da vagina. Coloque ponta da escova (cerdas) dentro do tubo coletor até tocarem o fundo. Entregue o frasco e a tampa para a técnica de enfermagem para que ela possa retirar a haste e tampar o frasco adequadamente. Cuidado para não derrubar o frasco e nem contaminar a tampa.



Anexo E – Carta-resposta enviada à participante com resultado negativo no teste de hr-HPV

Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos
Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular



Prezada Senhora:

Data de Nasc.:

Exame:

Gostaríamos de agradecer sua participação na pesquisa que vem sendo realizada nesta instituição para o rastreamento do vírus HPV de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68), conhecido por provocar infecções no colo do útero que, quando não tratadas de modo adequado, pode vir a desenvolver o câncer de colo do útero.

Após o exame para rastreio do HPV de alto risco da amostra coletada no dia DD.MM.AAAA, informamos que seu resultado revelou-se **NEGATIVO**.

Mesmo que a pesquisa para o HPV seja negativa, é muito importante que o exame de Papanicolaou seja realizado pelo menos uma vez ao ano como forma de prevenção do câncer de colo uterino.

Visite seu médico GINECOLOGISTA periodicamente.

Atenciosamente,

Equipe de pesquisa em HPV

Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular

Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII

Anexo F – Carta-resposta enviada à participante com resultado positivo no teste de hr-HPV

Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos
Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular



Prezada Senhora:

Data de Nasc.:

Exame:

Gostaríamos de agradecer sua participação na pesquisa que vem sendo realizada nesta Instituição para o rastreamento do vírus HPV de alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Informamos que o exame para detecção do HPV de alto risco realizado em DD.MM.AAAA revelou-se **POSITIVO**.

Esse resultado indica a necessidade de avaliação adicional através de exame de COLPOSCOPIA para se investigar a presença de possíveis alterações causadas pelo HPV no colo uterino. A senhora receberá convocação para comparecer no Hospital de Câncer de Barretos para realizar os exames necessários.

A qualquer momento você pode pedir novos esclarecimentos, fazer críticas e reclamações sobre este estudo através dos seguintes contatos: Pesquisador principal: Adhemar Longatto Filho e/ou Adriana T. Lorenzi – telefone (17) 3321-6600, ramal 7075/7094. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos - telefone (17) 3321-6600, ramal 6894.

É muito importante que a senhora faça o acompanhamento solicitado pelo médico responsável do departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos, para que o receba de forma adequada, conforme necessário e indicado pelo médico.

Visite seu médico GINECOLOGISTA periodicamente.

Atenciosamente,

Equipe de pesquisa em HPV

Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular

Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII

Anexo G – Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa**Comitê de Ética em Pesquisa
CEP**

Para: Jose Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

De: Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 18/03/2011

Projeto de Pesquisa: **404/2010**

Prezado (a) Senhor (a),

Venho, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos aprovou a resposta as pendências ao projeto **404/2010 “CareHPV teste de captura híbrida na Unidade Móvel pode melhorar o programa de rastreio do câncer cervical em Rural Brasileira e áreas remotas”**.

Atenciosamente,

*Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos*

Anexo H – Artigo original publicado

Gynecologic Oncology 131 (2013) 131–134



Contents lists available at ScienceDirect

Gynecologic Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygyno

Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test



Adriana Tarlá Lorenzi^{a,*}, José Humberto T.G. Fregnani^b, Júlio César Possati-Resende^c,
Cristovam Scapulatempo Neto^d, Luisa Lina Villa^{e,f}, Adhemar Longatto-Filho^{b,g,h,i,*}

^a Molecular Oncology Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^b Center for the Researcher Support, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^c Cancer Prevention Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^d Pathology Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^e Santa Casa de São Paulo Medical School, FCMSCSP, São Paulo, Brazil

^f Faculty of Medicine, Department of Radiology and Basic Oncology, São Paulo University, FMUSP, São Paulo, Brazil

^g Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, São Paulo University, FMUSP, São Paulo, Brazil

^h Life and Health Sciences Research Institute, ICVS, School of Health Sciences, Minho University, Braga, Portugal

ⁱ ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

HIGHLIGHTS

- High-risk HPV was tested in careHPV™ methodology.
- HPV test self-sampled material is useful for cervical cancer screening.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 21 July 2013

Keywords:

Human papillomavirus
Cervical cancer
Self-sampling
Molecular test
Screening

ABSTRACT

Objective. Cervical cancer is the second most common cancer among Brazilian women. High-risk human papillomavirus (hr-HPV) persistence is the primary cause of cervical neoplasia. Early detection of hr-HPV is important for identifying women at risk for developing cervical lesions. Approximately 85% of new cases of cervical cancer worldwide and 50% of the total cervical cancer deaths occurred in developing countries. Here, a new methodology to support a cervical cancer screening program was evaluated in women from various Brazilian regions.

Methods. Two thousand women aged 18–77 years were enrolled in an opportunistic cervical cancer screening program and were randomized into self-vaginal or health professional-guided cervical sampling groups. The Qiagen careHPV™ test was performed on all samples. Pap tests were performed on all women using liquid-based cytology.

Results. Positive hr-HPV results were obtained in 12.3% (245/2000) of women; similar rates were observed in self- or health professional-collected samples. Eighty-nine percent (1719/2000) of cervical cytologies classified as normal were negative to hr-HPV. Among the cytological samples, 36.6% classified as ASC-US + were positive to hr-HPV, 78.8% were LSIL and 75.0% were HSIL.

Conclusions. Self-sampled and health professional-sampled vaginal/cervical specimens did not differ in their rates of detection of hr-HPV. Therefore, HPV DNA testing in self-sampled vaginal cells is an alternative to primary screening in low-resource settings.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cervical cancer (CC) is a well-known disease worldwide and remains a critical public health issue in developing countries that

lack appropriate screening programs. Consequently, 85% of cases and 50% of deaths due to CC occur in developing countries, particularly in the poorest regions. Most Brazilian regions have dramatic indexes of mortality: CC is the second most common cancer among Brazilian women, with mortality rates estimated to be more than 10,000 deaths annually and more than 17,000 new cases occurring each year [1,2].

Human papillomavirus (HPV) infections are prevalent worldwide. Persistent hr-HPV infection is the single main risk factor for the development of premalignant and malignant cervical lesions [3]. HPV causes virtually all cases of cervical cancer [4]. Cervical cancer screening

* Corresponding author at: Laboratory of Medical Investigation (LIM) 15, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo 1246-903, Brazil. Fax: +55 11 3061 7413.

E-mail addresses: adriana.lorenzi@gmail.com (A.T. Lorenzi), mdfregnani@terra.com.br (J.H.T.G. Fregnani), julio.possati@uol.com.br (J.C. Possati-Resende), cristovamscapula@uol.com.br (C.S. Neto), luisapvilla@gmail.com (L.L. Villa), longatto16@hotmail.com (A. Longatto-Filho).

programs are tailored to optimize the identification of precursor lesions of cervical cancer, thereby contributing to reduction of the associated mortality. Cervical cancer develops over a long period of time (approximately 20 years from the initial HPV infection to the onset of invasive cancer), which allows for preventive actions. [5]. A combination of HPV testing with liquid-based cytology screening has been demonstrated to improve the algorithm to protect women against CC. HPV DNA testing is considered to be the most efficient tool to screen women at risk for cervical diseases because of the higher sensitivity in comparison to the cytology examination [6–8]. This superior sensitivity prevents the high rates of false-negative results usually associated with cytological examination. As the cytology demands very qualified skill and stringent internal quality control system, HPV test could be an alternative to optimize the cervical screening programs in countries or regions where the cytology test is not feasible to be implemented.

Recently, a new molecular HPV DNA test (careHPV™) was developed to detect 14 of the main hr-HPV strains (16, 18, 31, 33, 34, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) in low-resource or technically poor settings. The careHPV™ system does not require electricity or flowing water and provides results for up to 90 samples in a total of 4 h. The test is portable and can be performed under suboptimal laboratory conditions and in very small spaces. Moreover, the test is a user-friendly and reproducible system that encompasses a few easy steps [9]. In comparison with the performance of the conventional Pap test, HPV DNA testing is more sensitive, practical and analytically objective [5,10,11]. Despite the lower positive predictive value of self-sampled HPV DNA testing compared with cytology, a recent study [12] demonstrated that notable HPV results improved the detection of CIN2+ in developing countries, particularly in settings with poor human and technology resources. The sensitivity of HPV DNA testing is fundamental for women with limited access to traditional screening. We anticipated that this HPV test could be an excellent option for primary screening in many regions of Brazil. The objective of this study was compare the careHPV™ test results from self-sampling and health professional collection specimens.

Methods

Study design

This study was performed between March and December 2012 at the ambulatory wing of the Cancer Prevention department of Barretos Cancer Hospital (BCH), Barretos, São Paulo, Brazil. Women were randomized into two groups: vaginal self-sampling vs. cervical health professional sampling. Sequentially numbered envelopes were prepared by a statistics department member of this institution (BCH) to guarantee adequate randomization. None of the professionals who implemented the randomization or done the sample collection knew the content of the envelopes (if the samples were self-sampled or collected by professionals health) or the results of the other tests. This study was registered in Clinical Trials (no. NCT01539668).

Ethics

All women received a patient information sheet explaining the study and provided written consent. The eligible women were invited and number registered to participate. Approvals were obtained from the BCH Research Ethic Committee.

Subjects and specimen collection

The study enrolled 2000 volunteer women in an opportunistic screening at BCH. Eligible women were older than 18 years. Participants were informed about the HPV test, CC, the importance of early detection and cervical cancer prevention and the study objectives. After signing the informed consent form, each woman picked up an envelope in the

number sequence that provided information about the study group. If she was sorted for self-sampling, a well-trained professional instructed the woman with an illustrative cartoon concerning how to take the vaginal sample without professional intervention; alternatively, the study nurse collected a standard cervical sample if the woman was referred to the professional sampling group.

Sample collection

The first sample collected was for hr-HPV diagnosis using the careHPV™ test. A conical-shaped brush (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) was used to take the vaginal specimen: the woman inserted the brush head into the vagina up to 10 cm, rotated it (clockwise) three times before removal and placed the brush immediately in a careHPV™ medium tube (QIAGEN, USA), which was delivered to and capped by the study personnel. The health professional interviewed the women in both groups to complete a structured questionnaire with socio-demographic information.

Pap test collection and preparation

A second specimen was collected for cervical cytology by a well-trained professional using a Rover's cytobrush with a removable brush head (Rover's, Holland). An endocervical and an ectocervical canal sample were placed immediately in SurePath® (Becton Dickinson, USA). Specimens were sent to the BCH Pathology Department, Barretos, São Paulo, Brazil, and then were analyzed and classified using the BD FocalPoint™ Slide Profiler. The specimens were reviewed by a cytotechnician, and altered cases (ASC-US+) were revised by a cytopathologist.

HPV DNA test

HPV DNA analysis was performed at the BCH Oncology Molecular Center, Barretos, São Paulo, Brazil, using the careHPV™ test, which comprises an in vitro nucleic acid hybridization assay with signal amplification using microplate chemiluminescence for the qualitative detection of 14-h HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) in cervical specimens [13].

Women were informed by letter about their results if they were HPV negative or were recalled to follow up if they were HPV positive. Women who tested positive for hr-HPV and/or with cytology ASC-H+ were referred for colposcopy and/or biopsy (if necessary).

Statistical analysis

The sample size calculation was based on the principle of an equivalence clinical trial, in which the new intervention and the standard one are equally effective. The prevalence rate of HPV infection was supposed to be around 10–15% in a low-risk population. Considering an alpha error of 5%, beta error of 10% and clinical acceptable margin of 5% between self-sampling and professional sampled groups, the sample size has been estimated from 756 to 1071 subjects in each arm [14].

Statistical analysis was accomplished using the computer software IBM® SPSS® Statistics (Statistical Package for Social Sciences) version 20.1 for Windows (IBM Corporation, Route 100, Somers, NY 10589). Chi-squared (χ^2) test was used to compare frequencies among groups. Student's *t*-test was used to compare means between groups, and Fisher's exact test was used when the χ^2 test was not sufficient for group comparison. In all tests, *p* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

A total of 2000 women aged 18–76 years were tested for hr-HPV using the careHPV™ test by either self-sampling or sample collection by a health professional. Two hundred forty-five specimens (12.3%)

Table 1
Comparison between the careHPV™ test, collection group and the valid socio-demographic women questionnaires.

	careHPV™ test		Source		
	Positive	p value	Self-sampling	Health professional	p value
Age (years)					
18–29	28.2% (66)	<0.0001	55.1% (129)	44.9% (105)	0.051
30–39	17.3% (60)		53.6% (186)	46.4% (161)	
≥40	8.4% (119)		48.3% (685)	51.7% (734)	
Parity					
None	23.6% (66)	<0.0001	52.5% (147)	47.5% (133)	0.645
1–2	10.9% (113)		49.6% (513)	50.4% (521)	
>2	9.5% (64)		49.3% (332)	50.7% (341)	
Sexual partners					
1	8.5% (98)	<0.0001	50.3% (577)	49.7% (571)	0.800
2–3	16.9% (81)		51.3% (245)	48.7% (233)	
>3	19.1% (53)		48.7% (135)	51.3% (142)	
Tobacco use					
Yes	13.4% (31)	0.587	49.8% (115)	50.2% (116)	0.970
No	12.2% (213)		49.9% (874)	50.1% (877)	
Contraceptive use					
Yes	21.3% (69)	<0.0001	50.9% (165)	49.1% (159)	0.708
No	10.6% (175)		49.8% (820)	50.2% (827)	

One unsatisfactory molecular test.

tested hr-HPV positive; 96.4% of women who participated in this trial declared that they have at least one Pap test before the study, and most reported only one lifetime sexual partner. No differences were observed between the collection groups (self or health professional) regarding variables such as parity, number of sexual partners, contraceptive and tobacco use ($p > 0.05$; χ^2 test) (Table 1). However, when we considered the careHPV™ results, differences between the collection groups were observed concerning the variables. Eleven percent of valid questionnaires included smokers; among them, 13.4% were positive for hr-HPV infection. In the non-smoking population, 12.2% were positive for the molecular hr-HPV test. Regarding contraceptive use, 16.45% of the participants used contraceptives; among them, 21.3% were positive for hr-HPV. Among the women who did not use contraceptives, 10.6% were positive for the molecular hr-HPV test ($p < 0.0001$; χ^2 test). Regarding parity and the number of sexual partners, statistically significant differences were also found.

A slightly higher frequency of hr-HPV positive results was observed in the self-sampling group compared with the professionally sampled group (13.5% (135) versus 11% (110), respectively), but these results were not statistically significant ($p = 0.087$). The mean age was slightly increased in the professional collection group (45.6 years), whereas that in the self-sampling group was 44.5 years ($p = 0.034$; Student's t -test).

Considering the cytological results, 10.5% of the non-relevant alteration (NILM) samples were positive for hr-HPV in the molecular test.

In four HSIL cases, three (75%) were hr-HPV positive. Additionally, 26 of 33 LSIL (78.8%) cases were positive for the careHPV™ test. Most (89.5%; $n = 1719$) of the women with NILM cytological results tested negative on the HPV molecular test (Table 2).

Discussion

HPV infection is a highly common sexually transmitted infection among young women, but it is mostly transitory. Conversely, the persistence of hr-HPV in women older than 40 years is associated with cervical cancer development. hr-HPV is the main cause of death by cancer among Brazilian women [5,11]. Currently, molecular HPV testing is indicated for screening women who are at risk for cervical lesion development because of its higher sensitivity, decreased subjectivity and better reproducibility compared with cytology [8–10]. Self-sampling is an important tool to test women for HPV infection, particularly in developing countries or remote areas, where it is possible to send such women kits with brushes, medium collection supplies and illustrative instructions. This option is relatively inexpensive and may benefit women who may not otherwise have access to the health system [15,16]. Independent of the HPV test used, generally, self-collected samples have similar frequencies of HPV DNA to samples collected by a health professional [17]. Our results endorse this premise because no difference was observed between collection procedures. Because careHPV™ is affordable and can be used in various settings with various collection samples, we

Table 2
Cytological results relative to careHPV™ test.

	careHPV™ test*		p value	Source*		p value
	Negative	Positive		Self-sampling	Health professional	
NILM	89.5% (1719)	10.5% (201)	<0.0001	49.9% (958)	50.1% (963)	0.738
ASC-US+	63.4% (26)	36.6% (15)		53.7% (22)	46.3% (19)	
LSIL	21.2% (07)	78.8% (26)		51.5% (17)	48.5% (16)	
HSIL	25.0% (01)	75.0% (03)		75.0% (03)	25.0% (01)	
Total	87.7% (1753)	12.3% (245)		50.0% (1000)	50.0% (999)	

The statistical test used to evaluate the groups was χ^2 , considering 0.05 of significance.

NILM = negative for intraepithelial lesion or malignancy; ASC-US+ = atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-H+ = atypical squamous cells of undetermined significance—cannot exclude high-grade lesion; AGC-US+ = atypical glandular cells of undetermined significance; AGC-H+ = atypical glandular cells of undetermined significance—cannot exclude high-grade lesion; LSIL = low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL = high-grade squamous intraepithelial lesion.

*It was excluded of the statistical data analysis two samples with unsatisfactory results (one careHPV™ test and one liquid-based cytology).

studied 2000 women subjected to careHPV™ analysis and found a positive hr-HPV reaction in up to 12% of them. The important point to emphasize is that these women live mostly in rural areas of São Paulo state and other states of the Brazilian federation, where regular medical assistance and medical facilities are scarce. However, the fraction of women we studied may not properly represent the rural population of São Paulo State. We therefore sought to test a simple and reliable HPV test in self- and non-self-collected samples to verify its potential use in rural remote areas and low-resource settings of Brazil.

Considering the socio-demographic findings, no association was found between hr-HPV positivity and tobacco use in either arm of the analysis (molecular results or collection group). Concerning parity, sexual partners and contraceptive use, no association with collection group was found. These data could be used to illustrate an adequate and homogeneous randomization system. However, these variables showed an association with hr-HPV positivity, as illustrated in Table 1. With these data, we hypothesize that our situation involves younger women, most of whom are contraceptive users and have fewer children. In other words, newer social and professional behaviors could increase the rates of hr-HPV infection in this population.

The performance of the careHPV™ test has also been evaluated in a large study conducted in China. Its accuracy was similar to that of another molecular test (Hybrid Capture II, Qiagen)[9]. The careHPV™ test had a higher sensitivity but a lower specificity compared with liquid-based cytology and visual inspection with acetic acid (VIA) to detect CIN2+, as described in the Chinese study. This lower specificity of the careHPV™ test can be explained by the fact that the presence of hr-HPV is not necessarily associated with a high-grade lesion [10]. However, in our study, only one HSIL cytological case was not found to be hr-HPV-positive using the molecular test. Conversely, 26 of 33 LSIL cytology (78.8%) cases were found to be hr-HPV positive using the molecular test. This end point raises an important question regarding careHPV™ sensitivity, which differs from that observed in other studies [9].

The careHPV™ test is expected to be commercially available in developing countries in the future. The results of HPV screening for cervical cancer combined with those of the Chinese study of the new hr-HPV test indicate that HPV testing is appropriate as a primary screening approach in low-resource settings for women who are at least 30 years of age [9,18]. Moreover, several lines of evidence have confirmed that HPV testing is superior to cytology as a primary technical method for screening.

In conclusion, the results presented herein demonstrate that self-collection of vaginal samples is equivalent to cervical sampling for HPV DNA detection and can be used in primary cervical cancer screening.

Conflict of interest

LLV is a consultant of Qiagen, BD and Roche for HPV DNA testing.

Acknowledgments

The authors thank the following: Cancer Prevention Department Team, Cleyton Zanardo de Oliveira and Allini Mafta of the Researcher Support Team and the Pathology Department of the Barretos Cancer Hospital. Rui Manuel Reis and André Lopes Carvalho from the Molecular Oncology Center; José Eduardo Levi from São Paulo University; Cintia B. Oliveira, Raphael Haikel Junior and Edmundo Mauad from Barretos Cancer Hospital. Luisa Lina Villa was supported by a grant from CNPq and FAPESP (INCT-HPV). Study Supported by CNPq - Process n° 573799/2008-3 and FAPESP n° 2008/57889-1. They also thank all volunteer women who participated of this study.

References

- [1] WHO/ICO. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008. Lyon: World Health Organization; 2008 [8 November 2011]; 2008.[Available from: <http://globocan.iarc.fr>].
- [2] WHO/ICO. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Summary report 2010. Lyon: WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer; 2010 [cited 2011 22 December 2011]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>].
- [3] Schiffman M. Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer* Jun 25 2007;111(3):145–53.
- [4] Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer* 2011;11:473.
- [5] INCA. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. Brasília: Ministerio da Saúde; 2010 [Contract No.: 10/12/2012].
- [6] Cox T, Cuzick J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: from evidence to policies. *Gynecol Oncol* Oct 2006;103(1):8–11.
- [7] Franco EL, Cuzick J. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine* Mar 14 2008;26(Suppl. 1):A16–23.
- [8] Longatto-Filho A, Schmitt FC. Gynecological cytology: too old to be a pop star but too young to die. *Diagn Cytopathol* Oct 2007;35(10):672–3.
- [9] Qiao YL, Sellors JW, Eder PS, Bao YP, Lim JM, Zhao FH, et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lancet Oncol* Oct 2008;9(10):929–36.
- [10] Zhao FH, Lewkowitz AK, Chen F, Lin MJ, Hu SY, Zhang X, et al. Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA test as a cervical cancer primary screening method. *J Natl Cancer Inst* Feb 8 2012;104(3):178–88.
- [11] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* Feb 12 1998;338(7):423–8.
- [12] Lazcano-Ponce E, Lorincz AT, Cruz-Valdez A, Salmeron J, Uribe P, Velasco-Mondragon E, et al. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. *Lancet* Nov 26 2011;378(9806):1868–73.
- [13] Qiagen. The careHPV test training guide. Germantown: Qiagen Corporation; 2008 .
- [14] Zhong B. How to calculate sample size in randomized controlled trial? *J Thorac Dis* Dec 2009;1(1):51–4.
- [15] Silva J, Ribeiro J, Sousa H, Cerqueira F, Teixeira AL, Baldaque I, et al. Oncogenic HPV types infection in adolescents and university women from north Portugal: from self-sampling to cancer prevention. *J Oncol* 2011;2011:953469.
- [16] Ogilvie GS, Patrick DM, Schulzer M, Sellors JW, Petric M, Chambers K, et al. Diagnostic accuracy of self-collected vaginal specimens for human papillomavirus compared to clinician collected human papillomavirus specimens: a meta-analysis. *Sex Transm Infect* Jun 2005;81(3):207–12.
- [17] Baldwin S, Santos C, Mendez Brown E, Nuno T, Giuliano A, Davis J, et al. Comparison of type-specific human papillomavirus data from self and clinician directed sampling. *Gynecol Oncol* May 2005;97(2):612–7.
- [18] Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* Apr 2 2009;360(14):1385–94.

Anexo I – Artigo de revisão publicado

Lorenzi et al. *Virology Journal* (2015) 12:112
DOI 10.1186/s12985-015-0342-0



VIROLOGY JOURNAL

REVIEW

Open Access

Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective



Adriana T. Lorenzi¹, Kari J. Syrjänen^{1,2} and Adhemar Longatto-Filho^{3,4,5,6*}

Abstract

This review tackles the issues related to disease burden caused by cervical cancer (CC) and its precursor (CIN) lesions in Brazil. A special focus is given to new technologies with potential to interfere with the development of CC by reducing the high-risk human papillomavirus (hr-HPV)-induced lesions that remain a major public health burden in all developing countries where organized screening programs do not exist. Globally, 85 % of all incident CC and 50 % of CC deaths occur in the developing countries. Unfortunately, most regions of Brazil still demonstrate high mortality rates, ranking CC as the second most common cancer among Brazilian women. Recently, CC screening programs have been tailored in the country to enable early detection of CC precursor lesions and thereby reduce cancer mortality. A combination of HPV testing with liquid-based cytology (LBC) seems to be a promising new approach in CC screening, with high expectation to offer an adequate control of CC burden in this country.

Keywords: Cervical cancer, HPV DNA test, Molecular diagnostic techniques, Cancer screening, Pap test

Introduction

Short overview on human papillomavirus (HPV)

Human papillomavirus (HPV) is a non-enveloped small (8000 bp) DNA-virus with circular double-stranded DNA, showing a specific tropism for human epithelial cells both in the skin and mucous membranes [1, 2]. Since the 1970's, evidence has been emerging causally linking HPV with different human neoplastic lesions. Until now, 200 HPV types have been fully characterized, comprising both i) cutaneous HPV types causing benign clinical manifestations known as skin warts (papilloma), ii) mucosal HPV types inducing benign papilloma, intraepithelial neoplastic and invasive cancer in the anogenital mucosa as well as in the respiratory (sinonasal, larynx, trachea, bronchus) and upper digestive tract (oral mucosa, oropharynx, esophagus) [3]. Of all HPV-associated malignancies, cervical cancer (CC) is undoubtedly the most important causing significant morbidity and mortality worldwide [3–5]. Given this plurality of HPV lesions in different anatomic sites, HPV types inducing asymptomatic or transient infections may use distinct strategies for transmission and propagation within the

epithelium, and also for their interactions with the immune system [6].

HPV is the causal agent, necessary for the development of CC, and identified in practically all cases when highly sensitive detection methods are used. Cancer development is associated with HPV persistence that leads to cellular transformation, disease progression to precancerous lesions and, if uninterrupted, to an invasive cancer [7, 8].

HPV types infecting genital mucosa (in both genders) are subdivided into high-risk (hr) and low-risk (lr) groups. This classification is based on established epidemiological evidence on their association with benign, precancerous and cancer lesions. The hr-HPV are 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59; whereas the lr HPV's include 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 and 81. It is now obvious that both hr- and lr-HPV infections do occur in different anatomic sites, inducing either benign, premalignant or malignant lesions [3, 5, 6, 9].

Human papillomavirus life cycle

The HPV life cycle is intimately linked with the programmed differentiation process of stratified squamous epithelia (cutaneous and mucosal), starting from the undifferentiated cells of the basal layer, capable of continuously dividing, and progressing through highly specific cellular events towards fully matured keratinocytes

* Correspondence: longatto16@hotmail.com

³Cancer Prevention Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil

⁴Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Lorenzi et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(on epithelial surface). In principle, HPV life cycle has three major phases. First, infectious virions access the basal layer through a micro-lesion, forming a virus reservoir where the viral genome is conserved as a low-copy number episomal form within the infected cell. Second, the viral genome replication occurs, whereby host cell DNA and the infected cells are divided into daughter cells, which can persist in the basal and parabasal layers and proceed to the division, or move and initiate the differentiation process. In the latter, activation of the late (L) gene expression and vegetative viral DNA amplification begin. This amplification leads to synthesis of a huge number of viral copies [6, 10, 11]. During hr-HPV infections, degradation of p53 and inhibition of pRb proteins by E6 and E7 viral proteins, respectively, promotes infected cell proliferation. These events are a critical determinant of the neoplastic grade, E6 and E7 expression levels being high in CIN 3 and low in CIN 1 lesions [4, 6, 12, 13].

Recent insights into HPV infections

HPV infection is most easily transmitted in sexual intercourse, and the risk is higher in women with an early onset of sexual activity (due to higher exposure to the virus) as well as in those with impaired immunity [14–16]. Cervical intraepithelial neoplastic (CIN) and CC have been causally linked with HPV infection, which is considered the necessary prerequisite for the malignant transformation [17]. Virus entry is considered to take place in the basal cells of the squamous epithelium, specifically at the *cervical transformation zone (TZ)*, where squamous epithelium meets the glandular epithelium of the endocervical canal. HPV-induced cell transformation is mediated by the viral E6 and E7 oncoproteins interfering with the cell cycle regulators of the host cells, starting at the basal cells layer and gradually extending to the full epithelial thickness [9, 18]. Once the infection is well established, the HPV genome is present as extra-chromosomal elements (episomes) in the nucleus, and the viral genome load is increased up to 50–100 copies per cell, while remaining high in the infectious phase [19, 20].

Natural history of HPV infections

The great majority of sexually active women and men are likely to be infected by HPV at least once in their life-time [21]. In general, the vast majority of all HPV infections (90 %) are cleared without clinical diseases, spontaneously by means of immune response and do not persist long enough to cause oncogenic progression. Only about 10 % of HPV infections are expected to remain persistent [3, 21]. Individuals who develop benign lesions may also show regression mediated by the host immune response. About 50 % of the new infections are not detected before of 6–12 months and the majority of those will clear within 24 months. According to another

concept on regression, the viral genome remains “latent” and may be reactivated by any trigger related e.g. to immune suppression or alterations of hormonal balance. When truly persistent, HPV infection bears a significantly increased risk for progression to high-grade lesion (CIN3) and CC during the years, if not adequately treated [3, 6, 9, 15, 16, 22].

Around 70 % of all CC cases are associated with hr-HPV 16 and 18, in contrast to benign genital warts, which are predominantly related to HPV 6 and 11. Of all hr-HPV genotypes, HPV 16 shows the highest probability for persistence, and thus has a major impact on the cancer risk. HPV 18 is the most frequent genotype found in adenocarcinomas [3, 6]. Up to 40 % of HPV infections are of mixed type, containing more than one HPV type. For this reason, the precise identification of the hr-HPV genotypes in HPV infections is important to disclose the woman at risk to develop CC. Despite the fact that also the majority of these infections clear spontaneously, persistent infections by oncogenic HPV are considered as a significant risk factor to CC [3, 21, 23].

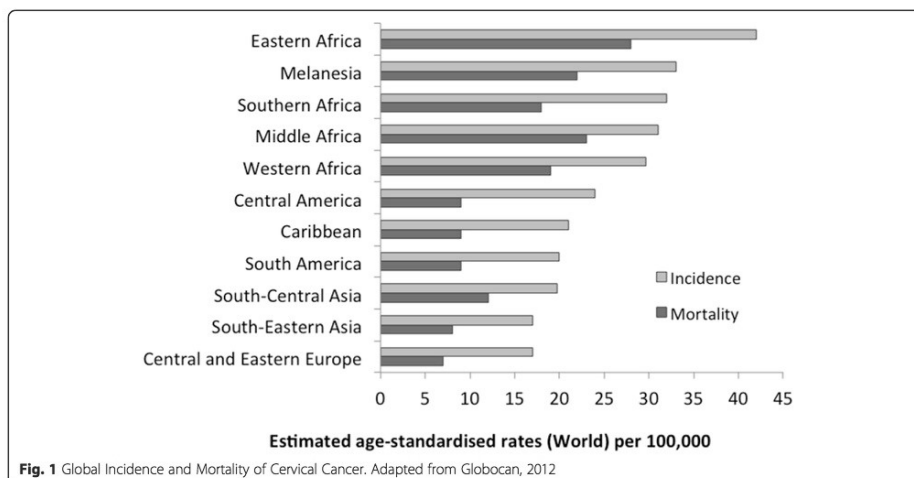
Cervical cancer incidence

According to the estimates for 2012, more than 528,000 incident cases and 266,000 deaths due to CC were detected worldwide [5]. About 85 % of these cases and 87 % total deaths occur in the developing countries, mainly due to poor access to health care for detection and treatment of early lesions [5]. The high-risk areas, with ASRs over 30 per 100,000 are Eastern Africa (42.7), Melanesia (33.3), Southern Africa (31.5) and Middle Africa (30.6) (Fig. 1). Brazilian figures comprise 24,500 incident cases and over 11,000 annual deaths (Fig. 2), with a mortality rate of 17 per 100,000 women [24–27].

The screening strategy in Brazil is targeted to women aged between 25 and 64 years, repeated every 3 years. Accordingly, the women should have Pap smear taken each three years if she has two consecutive normal smears in the previous screening rounds [28]. In the country, the mean age of detecting incident HPV infection, CIN3 and CC is about 20-, 30- and 40 years, respectively. The majority of the pre-malignant and malignant lesions affect squamous epithelium, where HPV types 16 and 18 predominate, the latter being relatively more important in glandular lesions (adenocarcinomas and their precursors) [14].

HPV detection in preventing cervical cancer

It is established that an organized population-based screening and treatment of the detected precursor lesions can decrease the disease mortality by 80 %, as shown e.g. in Finland [3, 21]. CC progresses relatively slowly, and it takes years or even decades from an incident HPV infection to develop an invasive cancer. This slow process offers an opportunity to interfere with this cascade by detecting

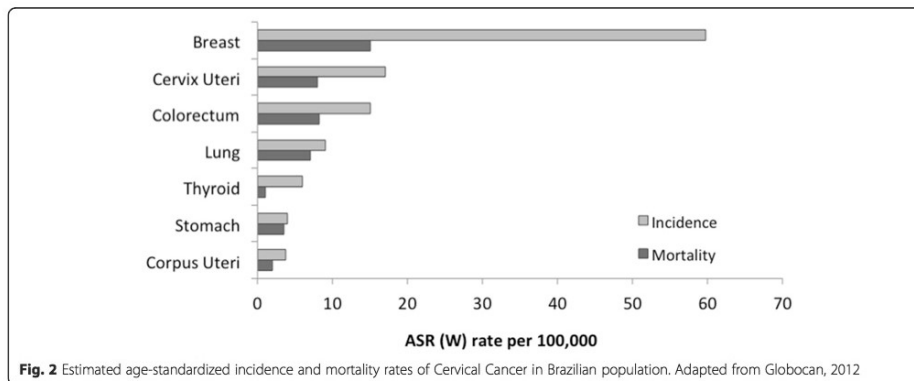


early precursor lesions and performs adequate therapy [3, 14, 21, 25, 29].

The first national initiative by the Brazilian government to implement a national screening program for CC was taken 40 years ago [30]. Since then, these programs have been improved and intensified, particularly during the past few years. A careful weighting is needed to optimize the program, i.e., to decide who are screened and when, based on a careful analysis between advantages and disadvantages, including the issues related to optimal cost-effectiveness.

Since its introduction, the cytological Papanicolaou smear (Pap test) has been considered as the method-of-

choice in organized screening for CC. When implemented as an organized program at population level, Pap smear screening has resulted in a substantial decrease of both incidence and mortality of CC [3, 21, 31]. In Brazil, there remains a lack of trained professionals with good skills in evaluating the Pap smears. Along with the huge territory, which represents another important obstacle, the scanty financial resources have been the limiting step in the full national implementation of Pap smear screening. Because of the same type of restrictions, most other developing countries continue showing high incidence and mortality rates of CC, in sharp contrast to many developed countries, with significantly reduced rates [21, 31, 32].



CC prevention in Brazil

Brazil has not implemented an organized population-based CC screening program, and not even a universal system to invite all women to realize these examinations. However, the government has designed a program to identify and control the cytopathology examinations performed. The first examination used to identify CC precursor lesions is the Pap test, targeted to women from 25 years (sexually active) to 64 years, repeated every 3 years for women who had two consecutive negative smears within five years. However, the guidelines (national and international) do not recommend screening for women younger than 25 years by Pap test, mainly because most of these lesions clear spontaneously [30, 33].

Recognition that HPV infection is the necessary cause of CC opened new possibilities for prevention strategies, including the primary prevention with highly effective prophylactic HPV vaccines, and the secondary prevention using highly sensitivity HPV tests, which has significantly improved the performance of the screening programs based on the Pap test [33–35].

Molecular techniques have been considered better than cytology regarding the sensitivity and reproducibility in detecting CIN 2 or CIN 3. Proper treatment of the precursor lesions detected by screening should prevent the development of invasive CC and reduce the incidence and mortality. Some HPV tests used in screening have achieved a 60–70 % reduction in invasive CC incidence as compared with cytology alone [36]. Despite some test limitations, HPV testing can be a useful tool in the primary screening, including the self-sampling strategies. It has been demonstrated that baseline HPV-negative women have a lower risk to develop CIN and invasive CC if compared with women testing Pap smear negative. The most recent HPV test equipment and protocols are user-friendly procedures, easily reproducible in different settings. This is a major advantage, because many regions of Brazil are still lacking human resources, necessary to appropriately implement the Pap test, including qualified professionals and adequate quality control measures. However, the non-organized Brazilian program severely restricts the implementation of a systematic molecular screening by HPV tests that are already in widespread use in many developed countries. This implementation is hampered by the difficulties in confirming the diagnoses, to conduct follow-up and offer treatment of the detected cervical lesions [36–38].

During the past several years, a plethora of novel methods have been developed for the hr-HPV DNA testing in CC screening. The use of HPV DNA testing for oncogenic types has been proposed as a co-test with cytology for screening women above 30 years of age, showing higher accuracy as conventional Pap smear screening [17, 39–41]. Thus, HPV DNA testing could offer an effective measure

to predict the risk of CC, suitable for implementation also in regions with lower resources [42]. Furthermore, self-collection of vaginal specimens for HPV testing could be useful particularly for women who live in regions with low-resource settings and restricted access to adequate health care, like in many regions of Brazil, thus increasing the acceptability and coverage of the screening program. However, HPV DNA testing is not yet a routine in Brazil, despite the fact that several studies in Brazilian population have demonstrated its potential usefulness in CC prevention [20, 43, 44].

The overall acceptance of HPV testing is higher among women who have experience on self-sampling (made at home), as compared with the physician collection [40]. Moreover, the self-sampling has lower cost and it is a truly non-invasive procedure. However, the gold standard of HPV testing still is the sampling by a physician (using speculum examination) [40, 45].

Which type of screening for which population?

For almost 60 years now, cervical cytology (conventional Pap smear and more recently LBC), has been the gold standard in CC screening programs. Based on early detection of CC precursor (CIN) lesions, both tests represent measures of secondary prevention of CC. However, organized screening based on cervical cytology has severe limitations in implementation; extensive training is mandatory, good laboratory infrastructure is necessary, and standardization and quality control are essential [14, 42, 46].

The well-established natural history of HPV infections is the sound basis for the rational use of CC preventive measures based on HPV testing. The single most important goal of CC screening is to reduce mortality. This is achieved by decreasing the incidence of invasive disease by detecting the precancerous lesions, followed by their adequate treatment [9, 46, 47]. Ronco et al (2008) concluded that women aged 25–34 years, who test HPV+ in HPV DNA screening do not need an immediate referral to colposcopy, because of the high probability of spontaneous regression of even CIN 2 lesions in this age group. Combination of HPV DNA testing and cytology further decreases the rate of false-positive results, thus reducing the colposcopy referral rates [17, 48]. Similarly, one can expect a substantial decrease of false-negative results (the inherent problem of cytology) when HPV screening is used, which is another advantage with significant impact on screening efficacy.

The vaccination and screening paradigm

Although HPV vaccination of teenagers and young women has proven effective in many countries, the public health strategies to demonstrate effective prevention of CC still represent major obstacles to overcome. The cost-effectiveness analysis for all strategies to reduce CC

incidence should involve both the screening and HPV vaccination in an integrated and organized manner. At the moment, the preferable option in Brazil seems to be the use of HPV testing for primary screening, followed by triage of all HPV+ cases with the Pap test. A recent Mexican trial [49] showed a most marked improvement in CC prevention when HPV test was used in governmental program, which sounds feasible given the known limitations of the Pap test. Indeed, the expected reduction of high-grade lesions after widespread introduction of HPV vaccination is anticipated to further compromise the performance of Pap test [49, 50].

According to WHO, HPV types 16 and 18 are responsible for 70 % of all CC cases worldwide. The currently available vaccines against these two HPV types have the potential of reducing the incidence of cervical and anogenital cancer. Brazil has a population of >64 million women aged above 15 years and at risk to develop CIN and CC, who certainly would benefit from HPV vaccines [29]. In this country, National Health System adopted the quadrivalent HPV vaccine to the national vaccination program in 2014. The vaccine is offered for girls at 11–13 years of age. This age range was extended to cover girls aging 9 and 10 years, and the coverage includes more than 33,000 HIV positive women between 9–26 years [35].

With the widespread implementation of HPV vaccines, HPV infections and HPV-related lesions will decrease substantially, which might increase the rates of false-negative results in cytology, in addition to reduced specificity. The combination of HPV vaccination with HPV testing and cytological triage is suggested to be the optimal algorithm to protect women against CC [16, 34, 47].

Conclusions

The most important applications of HPV testing include i) organized screening programs to optimize an early detection of HPV-induced CC precursor lesions, and, ii) to conduct adequate follow-up of the women who have been treated for high-grade CIN.

Some novel technical innovations of HPV testing are particularly designed for remote areas, without compromising the test performance for hr-HPV detection. Certainly self-sampling for HPV testing still needs standardization to make it compatible with the usual sampling techniques. Once successfully accomplished, it has a potential to become a valuable screening tool for large underprivileged populations, thus contributing to alleviating the significant disease burden in these countries.

Abbreviations

ASR: Age standardized rate; CC: Cervical cancer; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia; DNA: Deoxyribonucleic acid; HPV: Human papillomavirus; HPV+: HPV Positive; HR: High-Risk; IARC: International Agency for Research on Cancer; L: Later; LBC: Liquid-Based Cytology; LR: Low-Risk; TZ: Transformation zone; WHO: World Health Organization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ATL, KJS and ALF all contributed to design of the contents, writing, editing and revising this text. There are no conflicts of interest. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Molecular Oncology Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil. ²Biohit HealthCare Oyj, Helsinki, Finland. ³Cancer Prevention Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil. ⁴Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil. ⁵Life and Health Sciences Research Institute, ICVS, School of Health Sciences, Minho University, Braga, Portugal. ⁶ICVS/3B's – PT Government Associate laboratory, Braga, Portugal.

Received: 3 February 2015 Accepted: 13 July 2015

Published online: 25 July 2015

References

- Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, et al. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2011;20:113–23.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401:70–9.
- Syrjänen K, Syrjänen S: *Papillomavirus Infections in Human Pathology.* 1st ed. NY, USA: J.Wiley & Sons; 2000.
- Coelho FRGF, J. Fregnani J.H.T.G. Zeferino, L.C. Villa, L.L. Federico, M.H. Novaes, P.E.R.S. Costa, R.L.R. Câncer do Colo do Útero. São Paulo,Brazil: Tecmed; 2008.
- GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Accessed 05 Jan 2015.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F55–70.
- Schiffman M. Integration of human papillomavirus vaccination, cytology, and human papillomavirus testing. *Cancer.* 2007;111:145–53.
- Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer.* 2011;11:473.
- Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:368–83.
- Sakakibara N, Chen D, McBride AA. Papillomaviruses use recombination-dependent replication to vegetatively amplify their genomes in differentiated cells. *PLoS Pathog.* 2013;9, e1003321.
- Gross G, Tyring SK. Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases. Heidelberg: Springer; 2011.
- Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv.* 2006;61:53–14.
- Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013;31 Suppl 7:H1–31.
- Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 10:K29–41.
- Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011;121:4593–9.
- Stanley M. Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination. *Gynecol Oncol.* 2007;107:519–23.
- Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Mallila N, Tarkkanen J, Laurila P, et al. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:1612–23.
- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond).* 2006;110:525–41.

19. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol.* 2012;3:152.
20. Campos KL, Machado AP, Almeida FG, Bonin CM, Prata TT, Almeida LZ, et al. Good agreements between self and clinician-collected specimens for the detection of human papillomavirus in Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:352–5.
21. Syrjänen K, Hakama M, Saarikoski S, Väyrynen M, Yliskoski M, Syrjänen S, et al. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population. *Sex Transm Dis.* 1990;17:15–9.
22. Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K, Mulherkar R. HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *PLoS One.* 2012;7, e41012.
23. Oh Y, Bae SM, Kim YW, Choi HS, Nam GH, Han SJ, et al. Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types. *Cancer Sci.* 2007;98:549–54.
24. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F12–23.
25. INCA: Instituto Nacional do Câncer/ National Cancer Institute (Cancer in Brazil: data from population-base records). *Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional.* 2014. <http://www.inca.gov.br/cancerbrasil/2010/>. Accessed 20 Nov 2014.
26. WHO. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Accessed 20 Nov 2014.
27. WHO. Cervical Cancer - Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Accessed 20 Nov 2014.
28. WHO. Comprehensive Cervical Cancer Control - A guide to essential practice, 2nd edition: World Health Organization; 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf. Accessed 20 Nov 2014.
29. IARC. International Agency for Research on Cancer. Human Papillomavirus and Related Cancer in Brazil. Summary Report 2010. <http://screening.iarc.fr/doc/Human%20Papillomavirus%20and%20Related%20Cancers.pdf>. Accessed 20 Nov 2014.
30. MS/INCA. Ministério da Saúde e Instituto Nacional do Câncer (Health Ministry and National Institute of Cancer) (Brazilian guidelines for screening of cervical cancer). Diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer de colo do útero. 2011. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/rastreamento_cancer_colo_utero.pdf. Accessed 08 Jan 2015.
31. Lowy DR, Solomon D, Hildesheim A, Schiller JT, Schiffman M. Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer. *Cancer.* 2008;113:1980–93.
32. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA and versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1579–88.
33. Stormo AR, de Moura L, Saraiya M. Cervical cancer-related knowledge, attitudes, and practices of health professionals working in Brazil's network of primary care units. *Oncologist.* 2014;19:375–82.
34. Franco EL, Cuzick J. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 1:A16–23.
35. Saúde MMoH-Md: HPV vaccination. In Blog of Health/Blog da Saúde, 2015. <http://www.blog.saude.gov.br/index.php/35256-sus-oferta-vacina-contr-hpv-para-meninas-de-9-a-11-anos>. Accessed 10 Mar 2015.
36. Isidean SD, Franco EL. Embracing a new era in cervical cancer screening. *Lancet.* 2014;383:493–4.
37. Arbyn M, Verdoordt F, Snijders PJ, Verhoeve VM, Suonio E, Dillher L, et al. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014;15:172–83.
38. Navarro C, Fonseca AJ, Silbajev A, Souza CI, Araújo DS, Teles DA, et al. Cervical cancer screening coverage in a high-incidence region. *Rev Saude Publica.* 2015;49:17.
39. Castle PE, Glass AG, Rush BB, Scott DR, Wentzensen N, Gage JC, et al. Clinical human papillomavirus detection forecasts cervical cancer risk in women over 18 years of follow-up. *J Clin Oncol.* 2012;30:3044–50.
40. Zhao FH, Lewkowitz AK, Chen F, Lin MJ, Hu SY, Zhang X, et al. Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:178–88.
41. Zhao FH, Lin MJ, Chen F, Hu SY, Zhang R, Belinson JL, et al. Performance of high-risk human papillomavirus DNA testing as a primary screen for cervical cancer: a pooled analysis of individual patient data from 17 population-based studies from China. *Lancet Oncol.* 2010;11:160–71.
42. Castle PE, de Sanjosé S, Qiao YL, Belinson JL, Lazzcano-Ponce E, Kinney W. Introduction of human papillomavirus DNA screening in the world: 15 years of experience. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F117–22.
43. Lazzcano-Ponce E, Lorincz AT, Cruz-Valdez A, Salmerón J, Uribe P, Velasco-Mondragón E, et al. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. *Lancet.* 2011;378:1868–73.
44. Lorenzi AT, Fregiani JH, Possati-Resende JC, Neto CS, Villa LL, Longatto-Filho A. Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test. *Gynecol Oncol.* 2013;131:131–4.
45. Petignat P, Faltin DL, Bruchim I, Tramèr MR, Franco EL, Coutlée F. Are self-collected samples comparable to physician-collected cervical specimens for human papillomavirus DNA testing? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2007;105:530–5.
46. Jordan J, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Schenk U, Baldauf JJ, Da Silva D, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for clinical management of abnormal cervical cytology, part 1. *Cytopathology.* 2008;19:342–54.
47. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenk U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition—summary document. *Ann Oncol.* 2010;21:448–58.
48. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:492–501.
49. Lazzcano-Ponce E, Lorincz AT, Salmerón J, Fernández I, Cruz A, Hernández P, et al. A pilot study of HPV DNA and cytology testing in 50,159 women in the routine Mexican Social Security Program. *Cancer Causes Control.* 2010;21:1693–700.
50. Longatto-Filho A, Schmitt FC. Gynecological cytology: too old to be a pop star but too young to die. *Diagn Cytopathol.* 2007;35:672–3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

