

COMPARAÇÃO ENTRE TESTE DE DETECÇÃO DE DNA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO PELO SISTEMA DE CAPTURA HÍBRIDA COM CITOLOGIA EM ESFREGAÇOS CERVICAIS.

Maristela Gabriel¹; Eloisa De Brida Tormena² & Robson José Da Silva Souza³

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) possui importância significativa na etiologia de câncer cervical invasivo e suas lesões precursoras, sendo necessária a aplicação de metodologias moleculares para o diagnóstico precoce desta infecção. O presente trabalho avaliou a eficácia do sistema de Captura Híbrida na detecção de tipos patogênicos de HPV, por comparação com critérios citológicos estabelecidos empiricamente em espécimes com alterações celulares sugestivas de infecção pelo HPV, como também foi avaliado a presença em espécimes citologicamente normais, com inflamação e com Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Cento e oito mulheres foram selecionadas por apresentarem suspeitas de infecção por HPV (suspeita clínica ou citológica). Os resultados demonstraram que os dois métodos foram complementares, já que os resultados da citologia foram confirmados pela Captura Híbrida. Os dois métodos podem ser utilizados em conjunto para melhorar o diagnóstico e além disso, a utilização de teste de Captura Híbrida no diagnóstico de HPV, permite a identificação do tipo de risco proporcionado pelo vírus.

Palavras-chave: Papiloma vírus, DNA, Captura híbrida, Colpocitologia.

EFFECT OF NOT THE APPLICATION OF THE QUALITY CONTROL OF THE WATER IN THE NOURISHING INDUSTRIES

ABSTRACT

The Human Papilloma Virus (HPV) has significant importance in invasive cervical cancer etiology of and its precursory injuries. Thus, it is necessary the application of molecular methodologies for the precocious diagnosis of this infection. This research has evaluated the effectiveness of Hybrid Capture System (HCS) in detecting pathogenic types of HPV. HCS was compared with empirical established cytological criteria in specimens with cellular alterations that were suggestive of HPV infection. The presence of HPV was also evaluated in cytological normal specimens with inflammation and Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). One hundred and eight women, suspected of HPV infection (clinical or cytological suspicion), were selected. Results demonstrated that both methods were complementary, since Hybrid Capture confirmed results of the cytology. The two methods may be used together to improve the diagnosis. Furthermore, the use of Hybrid Capture test in HPV diagnosis allows the identification of the risk that the virus proportionate.

Key words: Human Papillomavirus; DNA; Hybrid Capture; Colpocytology

¹ Universidade Estadual de Maringá – UEM.

² Laboratório Fenix–Maringá-PR.

³ Laboratório Santo Antonio–Maringá-PR



INTRODUÇÃO

Inúmeras evidências têm estabelecido um papel central para o Papilomavírus Humano (HPV) na etiologia de câncer cervical invasivo e suas lesões precursoras. Aproximadamente dezoito genótipos de HPVs que infectam o sistema genital são responsáveis por mais de 90% dos cânceres cervicais e são associados ao HPV de alto risco (12). Existem outros genótipos de HPV podem produzir anormalidades citológicas mais brandas, e são denominados de HPVs de baixo risco.

A introdução de testes de detecção de DNA de Papilomavírus humano tornou-se um fator relevante nos programas de prevenção de câncer cervical, os quais podem revelar uma ampla tipologia patogênica de HPV, tendo em vista que o câncer da cérvix uterina é uma das principais causas de óbito entre mulheres, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (2). Desta maneira, quanto mais precocemente forem detectadas as lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas, maiores são as probabilidades de prevenção ou de cura, reduzindo-se assim os índices de mortalidade por essa patologia. A análise citológica de esfregaços cervicais, é geralmente usada em estudos para diagnóstico de câncer cervical e lesões cervicais pré-malignas (Neoplasia Intraepitelial Cervical - NIC), com subsequente diagnóstico pela colposcopia e exame histopatológico de biópsias cervicais. A identificação de genótipos de Papilomavírus humano (HPVs), considerados de alto risco como os HPVs dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, têm criado a expectativa de que a detecção de DNA destes ganótipos possam ter grande valor na identificação de mulheres com o risco de desenvolver lesões pré-malignas ou malignas (10). Vários estudos epidemiológicos tem dado suporte a esta hipótese. A prevalência de HPVs oncogênicos em câncer cervical determinada por análise pela PCR (Polymerase Chain Reaction) é de cerca de 90% (10) sendo que a prevalência de HPVs oncogênicos em espécimes de biópsias cervicais está fortemente correlacionada com o grau de NIC. As taxas de prevalência variam entre 26 a 67% para o grau I (NIC) e 75 a 86% em graus II e III (1,4). Cuzick e colaboradores (6) relataram que a PCR detectou uma alta incidência do genotipo HPV 16 nos esfregaços analisados havendo a associação entre esta incidência e a presença de lesões de alto grau

de colo uterino. Koutskiy e colaboradores (11) observaram que em esfregaços citologicamente normais, a presença de DNA de HPV quando determinada pelo método de hibridização Virapap, correlacionava-se com a detecção de lesões de alto grau (NIC III) dentro de três anos.

Embora a colpocitologia seja eficiente na redução do índice de câncer cervical, este método ainda apresenta limitações, pois cânceres cervicais podem ser encontrados em pacientes com resultados negativos de citologia cervical (3).

A Captura Híbrida é uma nova geração de testes de DNA que foi desenvolvida especificamente para a rotina em laboratório clínico. É um teste não radioativo destinado à detecção de DNA de 18 tipos de HPV, divididos dentro de dois grupos de HPV. Um grupo com 13 tipos de HPV, que são os HPVs de alto risco, associados ao câncer anogenital (HPV tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e outro grupo com 5 tipos de HPV, que são os HPVs de baixo risco, associados ao Condiloma Acuminado (HPV tipos 6, 11, 42, 43, 44) (2,12). Estes dois grupos de HPV também são denominados de HPVs do grupo 11 e HPVs do grupo I, respectivamente. Ambos, os grupos de alto e baixo risco, podem ser detectados em esfregaços cervicais normais ou com NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical).

Métodos adequados para detecção de DNA de HPV são essenciais para a interpretação dos achados epidemiológicos com respeito ao papel da infecção pelo HPV na etiologia do câncer anogenital e na prevenção do câncer de colo uterino.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do teste de detecção de DNA de HPV pelo sistema de Captura Híbrida em comparação com os critérios citológicos estabelecidos empiricamente em relação a: a) achados citologicamente normais; b) achados citológicos com inflamação; c) sugestivos de infecção por HPV; d) sugestivos de infecção por HPV e NIC; e) NIC.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada

Neste estudo foram selecionadas cento e oito mulheres, participantes de programa de prevenção de câncer cervical, triadas em consultórios médicos particulares com suspeitas clínica ou citológica de infecção por HPV. Os critérios para inclusão da paciente foram: a realização de exame de colpocitologia e Captura Híbrida, respeitando o prazo máximo de 30 dias entre a realização do exame colpocitológico e a coleta de material para a realização de Captura Híbrida, em virtude da biologia viral.

Métodos

Para análise colpocitologia, o material endocervical foi coletado por meio de escova citológica e o material ectocervical por espátula de Ayre. As lâminas foram imediatamente fixadas em etanol 95% ou fixador próprio e encaminhadas ao laboratório para estudos citopatológicos. A técnica de coloração foi a descrita por Shorr.

Para a coleta do material para o teste da Captura Híbrida foi utilizado um kit de coleta especial e o material obtido foi acondicionado em um tubo com solução conservadora, e posteriormente enviado ao Instituto de Pesquisa em Oncologia Ginecológica – São Paulo, SP, para a detecção do DNA de HPV. A detecção é realizada pela hibridização molecular de sondas de RNA de HPV de baixo risco ou de alto risco associada à utilização do anticorpo monoclonal conjugado à enzima fosfatase alcalina que ao ligar-se ao substrato quimioluminescente emite uma luz que é detectada por quimioluminescência ultrasensível sendo expressa em RLU (Relative Light Units), o aparelho utilizado para a leitura foi um luminômetro. Uma solução com 1 pg de DNA de HPV 11 e uma com DNA de HPV 16 com 1 pg de DNA viral, que equivale a uma cópia de vírus por célula, serviram com o controles positivos para sonda de HPV de baixo risco e sonda de HPV associados ao câncer, respectivamente. Os resultados obtidos são quantitativos, pois valores de RLU menores que 5,0 indicam pequeno número de cópias virais por célula, podendo significar infecção inicial ou em fase de remissão, enquanto que valores de RLU maiores indicam maior taxa de cópias virais por célula.

RESULTADOS

A figura 1 apresenta os números percentuais dos resultados colpocitológicos

das 108 pacientes avaliadas. Observou-se que 21 % das pacientes (n=23) não apresentaram nenhuma anormalidade citológica; 21 % ou n=23 pacientes apresentaram alguma alteração celular compatível com inflamação; 19% das pacientes (n=20) tinham alterações citológicas compatíveis com infecção por Papilomavírus; 14% ou n=15 pacientes apresentaram o resultado HPV-NIC I, pois foi observada a presença de atipias celulares compatíveis com HPV e compatíveis com neoplasia intraepitelial cervical de grau I; 9% das pacientes (n=10) apresentaram HPV-NIC II, ou seja, alterações citológicas sugestivas de infecção por HPV e de neoplasia intraepitelial de grau II; HPV-NIC III foi observado em 3% ou n=3 dos casos estudados; 8% das pacientes (n=9) apresentaram NIC I, ou seja, alterações celulares compatíveis com neoplasia intraepitelial de baixo grau; e em 5% das pacientes (n=5) observou-se alterações celulares compatíveis com NIC II.

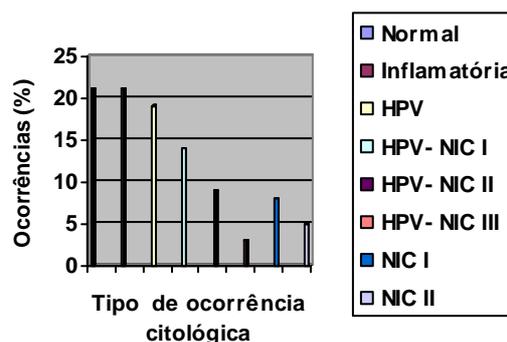


Figura 1. Números percentuais dos resultados colpocitológicos das 108 pacientes avaliadas.

A detecção ou não do DNA de HPV pelo teste da Captura Híbrida em 108 pacientes está demonstrado na figura 2, onde é possível observar que em 44% das pacientes (n=47) não foi detectada a presença de DNA/HPV; em 8% das pacientes (n=9) observou-se a presença de DNA/HPV do grupo I, ou seja, a presença de DNA de Papilomavírus de baixo risco, os quais estão relacionados com Condilomas Exofíticos; 28% das pacientes (n=30) apresentaram como resultado a presença de DNA/HPV do grupo II, ou seja, de alto risco de malignidade, correspondendo aos genótipos de HPV relacionados com o câncer de colo uterino; e em 20% dos casos (n=22) observou-se a presença de DNA dos dois grupos de HPV, de alta e baixa malignidade.

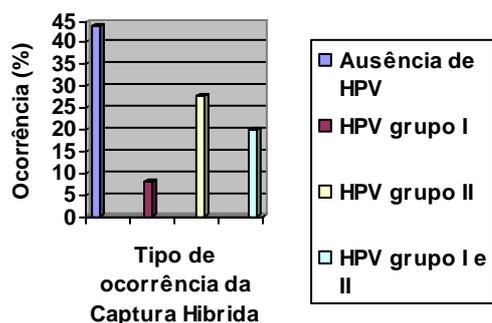


Figura 2. Números percentuais da detecção do DNA de HPV pelo teste da Captura Híbrida do material coletado do colo uterino de 108 pacientes.

A figura 3 apresenta uma comparação entre os resultados colpocitológicos e o teste da Captura Híbrida, na qual foi observado que 30% das pacientes (n=33) apresentaram positividade para HPV nos dois tipos de exames realizados, em 30% das pacientes (n=32) não houve detecção de HPV nem pela colpocitologia nem pela Captura Híbrida, mas em 14% das pacientes (n=15) somente a análise colpocitológica detectou a presença de atipias celulares compatíveis com HPV, enquanto que em 26% das pacientes (n=28) foi detectado o DNA de HPV somente pelo método de Captura Híbrida.

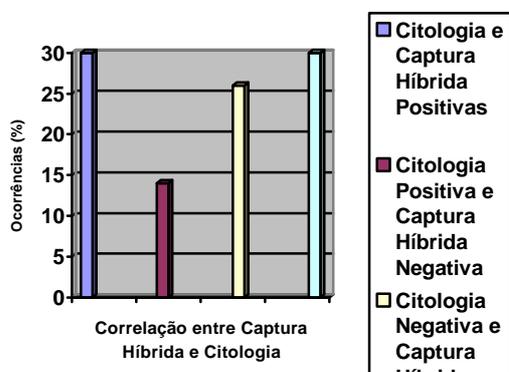


Figura 3. Comparação entre os resultados da colpocitologia e o teste da Captura Híbrida das 108 pacientes avaliadas

Na tabela 1 observa-se que dos 31 casos em que se detectou a presença de DNA de HPV do grupo I, ou seja, HPV de baixo risco, pelo teste da Captura Híbrida, 62% dos casos (n=19) eram de pacientes onde a análise colpocitológica também detectou a presença de alterações celulares compatíveis com infecção por HPV. Dos 31 casos positivos para a presença de DNA/HPV de baixo risco observou-se que 21 casos apresentavam alto número de cópias virais por célula (acima de 5 RLU), como o observado no exame da

paciente número 88, que apresentou uma taxa de RLU igual a 610,72 (dados não mostrados), resultados com uma taxa tão alta de cópias virais por célula indicam um alto grau de infecção viral.

Na tabela 2, observa-se que dos 52 casos em que se detectou a presença DNA de HPV do grupo II, ou seja, de alto risco, em 50% casos (n=26) também foram detectadas alterações celulares compatíveis com HPV pela análise colpocitológica, deve ser salientado que deste 26 casos, 13 casos apresentaram mais que 50 cópias do virais por célula. Houveram casos de pacientes que apresentaram uma taxa de RLU de que corresponde mais de 2000 cópias virais por célula, com o no caso da paciente número 98 que apresentou uma taxa de RLU igual a 2623,90 cópias virais por célula (dados não mostrados), indicando assim um alto grau de infecção.

Nos casos em que há baixo número de cópias virais por célula (taxa RLU < 5), pode significar que a infecção é inicial ou está em fase de remissão espontânea.

Tabela 1 Taxa de RLU de exames positivos para DNA/HPV de baixo risco distribuídos conforme os resultados da colpocitologia.

	Taxa de RLU ⁴				Total
	< 5	5,1 a 50	50,1 a 100	> 100	
Citologia					
Normal	-	4	-	2	6
Inflamatória	2	-	-	1	3
HPV	7	8	1	3	19
NIC I	1	-	-	1	2
NIC II	-	-	1	-	1
Total	10	12	2	7	31

Tabela 2 Taxa de RLU de exames positivos para DNA/HPV de alto risco distribuídos conforme os resultados da colpocitologia.

	Taxa de RLU ⁵
--	--------------------------

⁴ RLU (Relative Light Units), indica o número de cópias virais por célula.

Resultados colpocitológicos HPV, HPV-NIC I, HPV-NIC II e HPV-NIC III foram incluídos na categoria HPV.

⁵ RLU (Relative Light Units), indica o número de cópias virais por célula.

Citologia	< 5	5,1 a 50	50,1 a 100	> 100	Total
Normal	3	1	2	3	9
Inflamatória	1	3	1	2	7
HPV	5	8	1	12	26
NIC I	3	2	-	1	6
NIC II	-	-	1	3	4
Total	12	14	5	21	52

Pode-se observar com os resultados da Figura 4 que 44% pacientes examinadas (n=48) apresentaram resultado positivo para a presença de alterações celulares compatíveis com infecção por HPV detectado pela análise colpocitologia, enquanto que em 56% das pacientes (n=61), detectou-se a presença de DNA de Papilomavírus pela Captura Híbrida.

Houve coincidência de resultados para a detecção de HPV pelos dois métodos em 23% (n=33) do total de 108 casos.

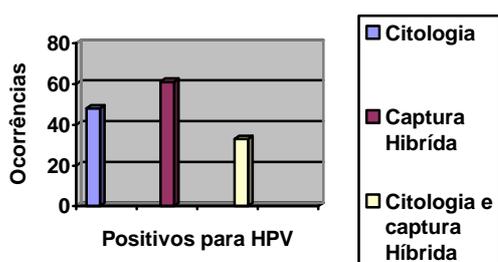


Figura 4. Resultados positivos para HPV obtidos citologia, captura híbrida e citologia e captura híbrida.

DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a eficácia do teste pelo sistema de Captura Híbrida na detecção de tipos patogênicos de HPV, em comparação com critérios citológicos estabelecidos empiricamente em espécimes com alterações celulares sugestivas de infecção pelo Papilomavírus, bem como avaliar sua presença em espécimes citologicamente normais, com inflamação e com neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

Dos 108 casos estudados, por intermédio da técnica da Captura Híbrida detectou-se a presença de DNA de HPV em 61 casos, ou seja, 56% dos casos estudados, sendo que em 52 casos detectou-se a presença de DNA de HPV do grupo II (

Resultados colpocitológicos HPV, HPV-NIC I, HPV-NIC II e HPV-NIC III foram incluídos na categoria HPV.

subtipos de HPVs ligados ao carcinoma de colo uterino); e 09 casos com DNA de HPV do grupo I somente (subtipos de HPVs associados aos Condilomas).

O maior número de casos com DNA/HPV de alto risco detectados pela Captura Híbrida concentram-se em pacientes que apresentam alterações celulares compatíveis com infecção por HPV e em pacientes com alterações celulares compatíveis com NIC (36 casos), sendo uma confirmação dos resultados da colpocitologia, uma vez que por meio da colpocitologia detectou-se a presença de alterações citológicas compatíveis com HPV em 48 dos 108 casos estudados, o que equivale a 44% do total avaliado. Deve ser salientado que houve compatibilidade de resultados entre colpocitologia e Captura Híbrida em 30% dos casos (n=33).

As maiores concentrações de DNA de HPV por célula detectadas pela Captura Híbrida foram observadas em pacientes que no exame colpocitológico, apresentaram como resultado alterações celulares típicas de infecção por HPV, ou alterações celulares compatíveis com Neoplasia Intraepitelial Cervical, e também uma grande relação entre a citologia e a Captura Híbrida na detecção de HPV, (tabela 1 e 2) pois algumas pacientes que apresentaram alterações pelo HPV na colpocitologia, tiveram uma taxa de RLU acima de 2.000 cópias virais por célula.

Dos 108 casos estudados 23 casos que foram considerados citologicamente normais, no entanto a presença de DNA de HPV foi detectado pela Captura Híbrida em 10 casos. Neste caso, verificou-se que 43% dos casos normais apresentaram a infecção pelo HPV, em 09 casos foi detectada a presença do DNA de HPV de alto risco, e em três destes casos detectou-se uma concentração superior a 100 cópias virais por célula (tabelas 1 e 2). Em cinco destes pacientes foi detectado DNA de HPV dos dois tipos.

A técnica da Captura Híbrida detectou a presença do DNA de HPV em 79% (n=33 casos) do total de casos (n=42) casos de pacientes com NIC (NIC I, II e III, com e sem alterações celulares típicas de HPV), detectados pela colpocitologia; Deve ser salientado também que destes 33 casos, 28 apresentaram DNA de HPV do grupo II, ou seja, 85% das pacientes com NIC apresentaram DNA de HPV de alto risco

oncogênico. Estes dados são condizentes com a literatura pois sabe-se que os HPVs de baixo risco ocorrem normalmente em verrugas genitais ou em Lesões Intraepiteliais Escamosas de baixo grau, e que os HPVs de alto risco prevalecem em Lesões Intraepiteliais Escamosas de alto grau e câncer cervical (12), que entre 90 a 100% de lesões de alto grau são positivas para HPVs de alto risco oncogênico, e entre 0 a 2% para os tipos de HPVs de baixo risco oncogênico, como detectados pela PCR (1,12), reforçando mais uma vez dados da literatura que dão ao HPV o papel principal na etiologia do câncer cervical (9,12,13).

A Captura Híbrida detectou a presença de DNA de Papilomavírus em 56% dos casos, enquanto que pela colpocitologia detectou alterações citológicas compatíveis com HPV em 44% dos casos, e houve coincidência em 23% do total de casos estudados.

Com o uso da escova citológica no lugar do swab de Dracon, na coleta de material para Captura Híbrida, houve um aumento considerável da quantidade de DNA viral detectado pela Captura Híbrida. Talvez seja esta uma razão para ter aumentado os níveis de detecção de DNA viral nas amostras coletadas.

CONCLUSÃO

De acordo com inúmeros estudos (3, 6, 9, 13, 17), mulheres com infecção cervical por HPV de alto risco, têm grande probabilidade para desenvolver neoplasia de alto grau (NIC II e III) em tempo relativamente curto, sendo que cerca de 16 a 18% das mulheres infectadas com HPVs desenvolveram NIC II ou III em 24 meses (3). Por esta razão, torna-se necessária a detecção precoce do tipo de HPV presente nas lesões, para tratamento adequado.

A Captura Híbrida é uma técnica que pode ser usada em larga escala, pois como não há amplificação de DNA, há um pequeno risco de falso positivo, sendo rápida e de custo menor

que outras metodologias semelhantes (15,16). Outras vantagens da Captura Híbrida, este sistema é um método quantitativo podendo ser aplicado ao uso em rotina clínica para prevenção de câncer cervical, além disso, este teste é capaz de detectar concentrações mais baixas de DNA de HPV purificado do que outros métodos de hibridização de dot-blot, e inclui sondas para um largo espectro de tipos de HPV (5,6,17).

A detecção do DNA/HPV pela Captura Híbrida representa uma valiosa ajuda nos programas de controle de câncer cervical podendo ser incluído como uma rotina no auxílio médico/paciente, pois a utilização da Captura Híbrida para detecção de DNA/HPV de alto risco, em conjunto com a colpocitologia, seria benéfico em populações que apresentam uma baixa prevalência de HPV nos exames colpocitológicos.

Como foi demonstrado os dois métodos se complementam, pois os resultados da citologia foram confirmados pela Captura Híbrida. Os dois métodos podem ser usados em conjunto para um melhor diagnóstico, a detecção de mulheres com infecção pelo HPV pode ser melhorada com o uso da Captura Híbrida, já que através deste método é possível a identificação do tipo de HPV, de baixo ou alto risco.

Maristela Gabriel
 Eloisa De Brida Tormena
 Robson José Da Silva Souza
 UEM - Departamento de Análises Clínicas – Setor de Patologia.
 Avenida Colombo, 5790 · Maringá · Paraná – Brasil.
 CEP 87020-900. Email: mgabriel@uem.br.

Recebido em 02/02/06

Revisado em 15/03/06

Aceito em 26/03/06

REFERÊNCIAS

- (1) BERGERON, C.; BARRASSO, R.; BEAUDENON, S.; FLAMANT, P.; CROISSANT, O.; ORTH, G. Human Papillomaviruses Associated with Cervical Intraepithelial Neoplasia. - Great Diversity and Distinct Distribution in Low and High-Grade Lesions. **Am. J. Surg. Pathol**, s.L., v.16, p. 641-649, 1992.
- (2) BROWN, D. R.; BRYAN, J. T.; CRAMER, H.; FIFE, K. H. Analysis of Human Papillomavirus Types in Exophytic Condylomata Acuminata by Hybrid Capture and Southern Blot Techniques. **J. Clin. Microbiol**, s.L., v. 31, n. 10, p. 2667-2673, 1993.
- (3) BROWN, D. R.; RAWLINGS, K.; HANDY, V.; FIFE, K. H.; BRYAN, J. T.; CRAMER, H.; GRAHAM, M. Human Papillomavirus Detection by Hybrid Capture in Paired Cervicovaginal Lavage and Cervical Biopsy Specimens. **Journal of Medical Virology**, s.L., v. 48, p.210-214, 1996.
- (4) CORNELISSEN, M. T.; BOTS, T.; BRIET, M. F.; JEBBINK, M. F.; STRUYK, A. P.; VAN DEN TWEEL; GREER, J. G.; SMITS, H. L.; TER SCHEGGET, J. Detection of Human Papillomavirus Types by the Polymerase Chain Reaction and the Differentiation Between High-risk and Low-risk Cervical Lesions. **Virchows Archiv B Cell Pathol. Incl. Mol Pathol**, s.L., v.62, p.167-171, 1992.
- (5) COX, J. T.; LÖRINCZ, A. T.; ACHIFFIMAN, M. H.; SHERMAN, M. E.; CULLEN, A.; KURMAN, R. J. Human Papillomavirus Testing by Hybrid Capture Appears to be Useful in Triaging Women with a Cytological Diagnosis of ASCUS. **Am. J. Obstet. Gynecol**, s.L., v.172, n.3, p.946-954, 1995.
- (6) CUZICK, J.; TERRY, G.; HO, L.; HOLLINGWORTH, T.; ANDERSON, M. Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Smears as Predictor of High-grade Cervical Cancer. **The Lancet**, s.L., v.339, p.959-960, 1992.
- (7) CZERWENKA, K.; LU, Y.; HEUSS, F.; MANAVI, M.; KUBISTA, Buman, E. Papillomavirus Detection of Endometriosis Carcinoma with Squamus Defferentiation of the Uterine Corpus. **Gynecologic Oncology**, s.L., v.61, p.210-214, 1996.
- (8) FARTHING, A.; MASTERSON, P.; MASON, W. P.; VOUDEN, K. H. Human Papillomavirus Detection by Hybrid Capture and its Possible Clinical Use. **Journal of Clinical Pathology**, s.L., v.47, p.649-652, 1994.
- (9) HALL, S.; LORINCZ, A.; SHAH, F.; SHERMAN, M. E.; ABBAS, F.; PAULL, G.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Human Papillomavirus DNA Detection in Cervical Specimens by Hybrid Capture: Correlation with Cytological and Histological Diagnoses of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **Gynecologic Oncology**, s.L., v.62, p.353-359, 1996.
- (10) KIYABU, M. T.; SHIBATA, R. D.; ARNHEIM, N.; MARTIN, W. J.; FITZGIBBONS, P.L. Detection of Human Papillomavirus in Formalin-fixed, Invasive Squamous Carcinomas Using the Polymerase Chain Reaction. **Am. J. Surg. Pathol.**, s.L., v.13, p.221-224, 1989.
- (11) KOUTSKY, L. A.; HOLMES, K. K.; CRITCHLOW, C. W.; STEVENS, C. E.; PAAVONEN, J.; BECKEMANN, A. M.;

DEROUEN, T. A.; GAUOWAY, D. A.; VERNON, D.; KIVIAT, N. B. A Cohort Study Of the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3 in Relation to Papillomavirus Infection. **N. Engl. J. Med.**, s.L., v.327, p.1272-1278, 1992.

(12) LÖRINCZ, A. T.; REID, R.; JENSON, B.; GREINBERG, M. D.; LANCASTER, W. & KURMAN, R. J. Human Papillomavirus Infection of the Cervix: Relative Risk Associations of 15 Common Anogenital Types. **Obstet. Gynecol**, s.L., v.79, p.328-337, 1992.

(13) LÖRINCZ, A.T. Hybrid Capture: a Simple, Sensitive Method for the Routine Detectin of HPV DNA. **European Reserch Organization on Genital Infection and Neoplasia**. s.L., p. 59-62, s.D.

(14) NINDL, I.; ZAHM, D.M.; MEIJER, C.J. L.M.; WALBOOMERS, J.M.M.; SCHNEIDER, A. Human Papillomavirus Detection in High-grade Squamous Intraepithelial Lesions: comparison of Hybrid Capture Assay a Polymerase Chain Reaction System. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, s.L.,v.23, p.161-164, 1995.

(15) SCHNEIDER, A.; ZAHM; D. M.; GREINKE, C.; KIRCHMAYR, R. & NINDL, I. Different Detestability of High- Risk HPV in Smears from Incident in Prevalent High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **Gynecologic Oncology**, s.L., v.65, p.399-404, 1997.

(16) SMITS, H. L.; BOUEN, A.; LIESBETH J. M.; TJONG-A-HUNG, STEVEN, P.; VONK, J.; VAN DER VELDEN, J. A.; TEN, K., FIEBO, J. W.; KAAAN, A; JAN. A. Intennethod Variation in Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Smears. **J. of Clinical Microbiology**, s.L., v.33, n.10, p.2631-2636, 1995.

(17) SUN, X. W.; FERENCZY, A.; JOBNSON, D.; KOULOS, J. P.; LUNGU, O.; RICHART, R. M.; WRIGHT, T. C. Jr. Evaluating of he Hybrid Capture Human Papiomavirus Deoxyribonucleic Acid Detection Test. **American Journal of Obstetric Gynecologic**, s.L., v.5, n.173, p.1432-1437, 1995.

(18) WRIGHT, T. C.; SUN, X. W.; KOULOS, J. Comparison of Management Algorithms for the Evaluation of W omen with Low-Grade

Cytological Abnomality. **Obstetrics and Gynecology**, s.L., v.2, n.85, p.202-210, 1995.