

COINFEÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* E HPV EM MULHERES COM CONDILOMA ACUMINADO

CHLAMYDIA TRACHOMATIS AND HPV COINFECTIONS IN WOMEN WITH CONDILOMA ACUMINATA

Larissa D Marcolino¹, Jossimara Polettini², Andréa R Tristão³, Mariângela Esther A Marques⁴, João Manuel G Candeias⁵, Rodrigo Alessandro R Vela⁶, Márcia G Silva⁷

RESUMO

Introdução: a cervicite por *Chlamydia trachomatis* é reconhecida como uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) de origem bacteriana mais prevalentes no mundo e a infecção genital por Papilomavírus Humano (HPV) é uma das DST de origem viral mais frequentes. **Objetivo:** avaliar a taxa de coinfeção de *C. Trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado. **Métodos:** foram incluídas no estudo 30 mulheres com diagnóstico clínico e histopatológico de condiloma acuminado em região vulvar, vaginal ou perianal. As lesões genitais foram excisadas e seccionadas em duas metades, uma para exame histopatológico e outra para extração de DNA. A detecção do DNA de HPV nas amostras foi realizada empregando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), com posterior genotipagem pela reação de PCR multiplex com *primers* específicos para diferentes tipos virais. A pesquisa de *C. trachomatis* também foi realizada por PCR, empregando-se os *primers* PCT1 e PCT2. **Resultados:** a positividade de DNA-HPV nas amostras de condiloma acuminado foi de 100%, sendo detectados genótipos 6/11 em 33,3% das amostras, genótipo 18 em 6,7% e infecção por múltiplos genótipos em 56,7% das lesões, e em apenas uma amostra (3,3%) o genótipo não foi identificado. A positividade de *C. trachomatis* no canal cervical das mulheres com condiloma acuminado foi de 33,3%. **Conclusão:** a taxa de coinfeção de *C. trachomatis* e HPV, em mulheres com condiloma acuminado, é alta e a estratégia de rastreamento e tratamento da infecção clamidiana poderia ser incorporada na rotina ginecológica desse grupo de pacientes.

Palavras-chave: papilomavírus humano, *Chlamydia trachomatis*, condiloma acuminado, DST

ABSTRACT

Introduction: *Chlamydia trachomatis* is worldwide recognized as one of the most prevalent sexually transmitted diseases (STD) of bacterial origin, whereas genital Human Papillomavirus (HPV) infection is one of the most important STD caused by virus. **Objective:** evaluate the coinfection rate of *C. trachomatis* and HPV in women with condyloma acuminata. **Methods:** thirty women were included in the study based on clinical and histopathological diagnosis of condyloma acuminata in vulvar, vaginal or perianal region. The excised lesions were divided into two halves, one was submitted to a histopathological exam and the other to DNA extraction. *C. trachomatis* was detected by PCR using CTP1 and CTP2 primers and the HPV DNA was detected by PCR and subsequent typed by PCR with HPV specific primers. **Results:** the HPV DNA positivity was 100% in all samples. HPV type 6/11 was found in 33.3% of the samples, type 18 in 6.7%, and we also found infection with multiple HPV types in 56.7% of HPV induced lesions, and only one sample (3.3%) was not genotyped. The *C. trachomatis* positivity in cervical secretions of women with condyloma acuminata was 33.3%. **Conclusion:** the coinfection rate of *C. trachomatis* and HPV in women with condyloma acuminata is high and the screen and treat strategy for chlamydial infection should be incorporated to gynecology routine care in these patients.

Keywords: human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, condyloma acuminata, STD

INTRODUÇÃO

A infecção clamidiana é reconhecida como uma das mais frequentes doenças sexualmente transmissíveis (DST) de origem bacteriana no mundo e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) 90 milhões de casos novos ocorrem a cada ano¹. A prevalência de *Chlamydia trachomatis*, dependendo da população estudada, varia de 2,4%² a 37,4%³ e apresenta-se assintomática em até 76% das mulheres infectadas⁴.

Devido à característica silenciosa dessa infecção, podem ocorrer diversas complicações sendo a doença inflamatória pél-

vica a mais importante, podendo resultar em gravidez ectópica, infertilidade e dor pélvica crônica⁵. Há algumas evidências de que a *C. trachomatis* possa contribuir para outras complicações obstétricas, incluindo parto prematuro e rotura prematura de membranas⁶, além de consequências perinatais como mortalidade, pneumonia neonatal⁷ e conjuntivite⁸, como possíveis resultados de transmissão vertical.

Mulheres portadoras de alguma DST apresentam risco aumentado de adquirir infecção clamidiana⁹. Em estudo recente, cerca de 50% das mulheres HIV positivas avaliadas apresentaram infecção por *C. trachomatis*¹⁰. Nesse mesmo sentido, já foi relatado que mulheres soropositivas para *Herpes simplex virus* apresentaram maior taxa de soropositividade para *C. trachomatis*¹¹. Esses dados sugerem que fatores comportamentais e sexuais podem potencialmente contribuir para a aquisição dessas infecções.

As infecções cervicais por *Neisseria gonorrhoeae* apresentam características comuns à infecção clamidiana, podendo provocar cervicite e até mesmo sérias complicações gestacionais. Embora a prevalência de *N. gonorrhoeae* tenha reduzido nos últimos anos, a infecção por esse agente é um fator de risco para a presença de *C. trachomatis*. Em pacientes com gonorreia a prevalência de infecção clamidiana é extremamente alta, atingindo cerca de 70%¹².

As infecções genitais e perianais pelo papilomavírus humano (HPV) são as mais frequentemente diagnosticadas entre as

¹Graduada do Curso de Ciências Biológicas – Modalidade Médica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) - Brasil.

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) - Brasil.

³Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) – Brasil.

⁴Professora Adjunta do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) – Brasil.

⁵Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) - Brasil.

⁶Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) - Brasil.

⁷Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu (SP) – Brasil.

Trabalho desenvolvido no Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu. UNESP.

DST de origem viral, acometendo cerca de 30% da população sexualmente ativa, prevalência esta que atinge 65% de acordo com a população e o método diagnóstico empregado^{13,14}. Vários trabalhos têm sugerido que HPV e *C. trachomatis* têm papel central no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais¹⁵, possivelmente pela modulação da imunidade do hospedeiro e/ou presença de inflamação crônica.

No estado de São Paulo, as verrugas anogenitais passaram a ser a segunda causa mais importante das DST diagnosticadas nos ambulatoriais especializados¹⁶. Pacientes com condiloma acuminado têm maior chance de serem portadores de outras DST, que devem ser investigadas. Assim, considerando a via de transmissão da *C. trachomatis* e do HPV e a maioria das pacientes com cervicite por *C. trachomatis* ser assintomática, as mulheres com condiloma acuminado poderiam ser beneficiadas, em relação ao diagnóstico de *C. trachomatis*, na busca ativa dessa infecção.

OBJETIVO

Avaliar a taxa de coinfeção de *Chlamydia trachomatis* e HPV em mulheres com condiloma acuminado.

MÉTODOS

Foi realizado estudo prospectivo incluindo 30 mulheres com diagnóstico clínico e histopatológico de condiloma acuminado em regiões vulvar, vaginal ou perianal, atendidas no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no ano de 2007.

As mulheres que realizaram tratamento de infecções do trato genital inferior ou qualquer outra infecção, no período inferior a 60 dias ou que fizeram uso de antibióticos e as pacientes com menos de 72 horas de abstinência sexual, no momento do exame, foram orientadas quanto às condições ideais de exame e nova consulta foi realizada.

As pacientes incluídas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e responderam ao questionário para obtenção de dados sócio-demográficos. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo 19/2007).

Coleta de material para pesquisa de *C. trachomatis* e HPV

Durante o exame especular, empregando-se o espéculo bivalvo de Collins esterilizado e isento de qualquer lubrificante, foi realizado raspado endocervical com *cytobrush* para pesquisa de *C. trachomatis*. O material endocervical foi realizado em tubo Falcon de 15 mL com 1000 µL da solução de Tris-HCl 50mM pH 8,5 / EDTA 1mM pH 8,0 (TE) e armazenado a -20°C até o momento do processamento.

As lesões clinicamente sugestivas de doença HPV induzida foram submetidas à biópsia para confirmação histopatológica, selecionando-se a lesão de maior representatividade clínica. Após antisepsia do local e anestesia infiltrativa na base da lesão selecionada usando lidocaína a 2% foi realizada ressecção pela base com lâmina de bisturi número 15; compressão da ferida

com gaze cirúrgica por alguns minutos e, quando necessário, foi realizada a sutura da pele e/ou mucosa sangrante com fio de *mononylon* número 4.0.

A lesão excisada foi seccionada em duas metades, uma acondicionada em frasco contendo formol a 10%, que foi processada para análise histopatológica, e outra em tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL com 500 µL da solução de Tris-HCl 50mM pH 8,5 / EDTA 1mM pH 8,0 / Tween 20 0,5% (TET), e armazenada a -20°C até o momento do processamento.

Análise histopatológica das lesões genitais

Secções das lesões genitais clinicamente sugestivas de doença HPV induzidas foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo comum, obtendo-se cortes com cerca de 5µm de espessura que foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram coradas pelo método clássico de hematoxilina e eosina (HE). Nas lesões verrucosas, os critérios morfológicos avaliados foram: presença de acantose e papilomatose, presença de coilocitos e células binucleadas, hiperparaceratose e paraceratose nas camadas superficiais.

Pesquisa de *C. trachomatis* e HPV

A presença de *C. trachomatis* na endocérvice foi avaliada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o HPV, foram empregadas as técnicas de PCR e tipagem por PCR multiplex.

Inicialmente foi realizada a extração do DNA das amostras coletadas seguindo o protocolo descrito previamente¹⁷. Resumidamente, as amostras foram digeridas enzimaticamente com proteinase K em condições que favorecem a lise celular e a liberação de ácidos nucleicos em solução. A seguir, o DNA obtido foi submetido à purificação orgânica com CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) para eliminação de restos celulares e contaminantes que podem inibir sua amplificação pela PCR. Posteriormente, o DNA foi precipitado em etanol e ressuspenso em tampão TE para posterior utilização.

Para as reações de PCR foram preparados todos os *master mixes* em volume final de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x (Invitrogen); 2µL de MgCl₂; 0,5 µL DNTP *mix* 20 mM; 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (Platinum, Invitrogen); 1,25 µL de cada *primer* na concentração de 10 µM; 15,25 µL de água Milli-Q autoclavada (Milli Q Plus, Milipore) e 2 µL de cada amostra pesquisada. As incubações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycle Personal.

Para pesquisa de *C. trachomatis* foram utilizados os *primers* PCT1 e PCT2¹⁸, empregando-se os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e ciclagem de 95°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C durante 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão, seguido de mais 39 ciclos idênticos ao descrito, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, através da substituição do ácido nucleico por água Milli-Q autoclavada e controle positivo contendo DNA extraído de células McCoy infectadas por *C. trachomatis*.

Para pesquisa de HPV foram utilizados os *primers* GP5+ e GP6+¹⁹ empregando-se os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e ciclagem de 95°C durante 45 segundos para desnaturação,

47,7°C durante 45 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 44 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, através da substituição do ácido nucleico por água Milli-Q e controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa.

A extração do DNA das amostras estudadas foi verificada pela amplificação do gene constitutivo da β -globina. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) preparada em tampão tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1X e corada com brometo de etídio (Gibco BRL). O tamanho dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 50 pb e 100 pb (GE Healthcare) e visualizados sob transiluminação ultravioleta.

Tipagem de HPV

Para a determinação dos tipos virais presentes nas amostras que apresentaram positividade para DNA de HPV foi empregada a técnica de PCR multiplex. Foram utilizados *primers* específicos para os tipos 6/11, 16, 18²⁰. As reações foram realizadas em tubos para PCR de 0,2 mL em volumes totais de 20 μ L, contendo 0,6 μ L de cada *primer* na concentração de 10 μ M, 10 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix (Promega), 4,4 μ L de água Milli-Q autoclavada e 2 μ L da amostra de DNA. Os parâmetros utilizados foram 94°C durante 5 minutos e ciclagem de 94°C durante 1 minuto para desnaturação, 53,5°C durante 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

Também foi realizada a pesquisa de HPV33 através de PCR *primer*-específico²⁰. Em cada reação foram utilizados 0,6 μ L de cada *primer* na concentração de 10 μ M, 10 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix (Promega), 5,6 μ L de água Milli-Q autoclavada e 2 μ L da amostra de DNA. Os parâmetros utilizados foram 94°C durante 4 minutos e ciclagem de 94°C durante 1 minuto para desnaturação, 45°C durante 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, através da substituição do ácido nucleico por água Milli-Q, e controle positivo contendo clones de DNA de HPV específicos para cada um dos genótipos virais estudados.

Análise estatística

Os dados referentes ao estado civil, etnia, hábito de fumar e uso de anticoncepcional oral foram submetidos ao teste exato de Fisher para análise de associação com infecção por *C. trachomatis*. O nível de significância adotado para o teste empregado foi de 5%.

RESULTADOS

As variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas na **Tabela 1**. Em relação à idade, a mediana foi de 21 anos (15-42).

Todos os produtos de exérese ou *shaving* das lesões genitais clinicamente sugestivas de infecção por HPV submetidas à análise histopatológica foram diagnosticados como condiloma acuminado (**Figura 1**).

A positividade para DNA de HPV nas amostras de condiloma acuminado foi de 100,0%. O genótipo viral identificado com maior frequência foi o 6/11, representando 33,3% do total das amostras, seguido pelo genótipo 18 que representou 6,7% das amostras analisadas. As lesões HPV induzidas apresentaram expressiva porcentagem de infecção por mais de um genótipo de HPV, denominada infecção mista (56,7%) (**Figura 2**). Em apenas uma amostra (3,3%) o genótipo viral não foi identificado. Do total de pacientes incluídas no estudo 33,3% apresentaram positividade para DNA de *C. trachomatis* na secreção cervical.

DISCUSSÃO

Foram incluídas neste estudo todas as pacientes com verrugas genitais atendidas no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no ano de 2007 e a mediana da idade das pacientes foi de 21anos (15-42), 80,0% eram brancas e 76,7% estavam solteiras no momento da inclusão no estudo. Em relação a essas características, a literatura mostra que cerca de 25% das

Tabela 1. Variáveis sócio-demográficas das pacientes incluídas no estudo.

Variáveis	Positividade de <i>Chlamydia trachomatis</i> (n=10)	
	N (%)	p*
Estado civil		
Solteira (n=23)	8 (34,8)	1,000
União estável (n=7)	2 (28,6)	
Etnia		
Branca (n=24)	7 (29,2)	0,372
Não branca (n=6)	3 (50,0)	
Anticoncepcional Oral (12/25 [#])	7 (58,3)	0,111
Tabagismo (8/24 [#])	3 (37,5)	1,000

* Teste exato de Fisher

Total de pacientes avaliadas para essa variável

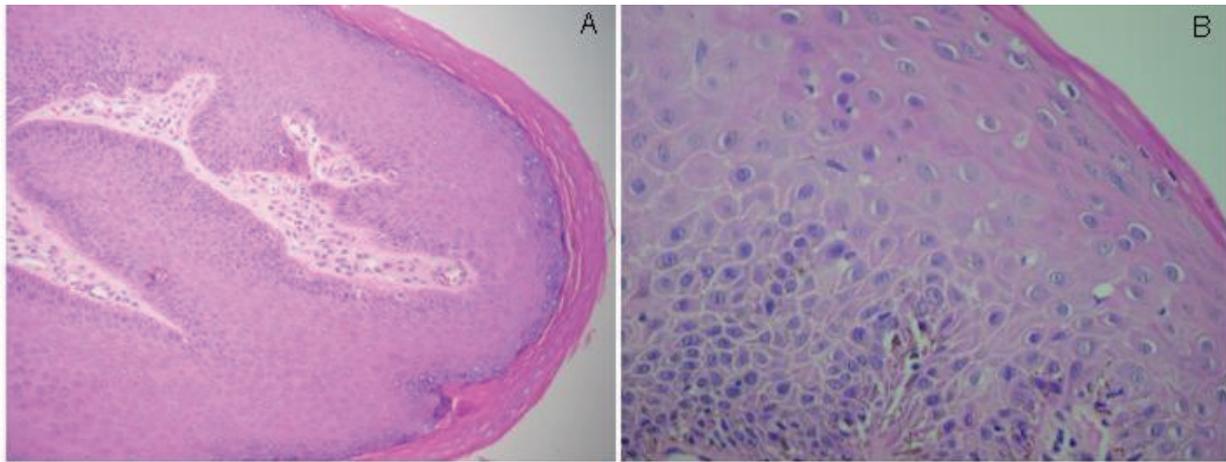


Figura 1. A. Fotomicrografia do corte histológico de lesão genital HPV induzida, evidenciando hipergranulose e paraceratose. HE. 200X. B. Fotomicrografia do corte histológico de lesão genital HPV induzida, evidenciando coilócitos. HE. 400X.

mulheres com verrugas genitais clínicas apresentam menos de 30 anos de idade³, suportando os achados de condiloma acuminado em mulheres mais jovens²¹.

Nesse estudo não foi encontrada relação entre a presença de infecção clamidiana e/ou presença de DNA-HPV e estado civil das mulheres estudadas. Essa relação também não foi descrita por outros relatos da literatura^{4,15}. Quanto à etnia, Blas *et al.*⁶ encontraram infecção clamidiana mais comumente em mulheres não-brancas, associação esta que não foi verificada em nosso estudo, tendo em vista a predominância de mulheres brancas.

Em relação a outros fatores sócio-demográficos, 33,3% das mulheres incluídas no estudo referiram o hábito de fumar e 48,0% das pacientes faziam uso de contraceptivos orais. O tabagismo é fator de risco para a infecção clamidiana¹⁴, e segundo trabalhos descritos, o hábito de fumar também é um dos principais fatores associados à presença do condiloma acuminado,²¹ aumentando o risco de recidiva das lesões HPV induzidas ou a progressão dessas lesões devido à persistência da atividade viral.

Achados da literatura sugerem que o uso de contraceptivos orais não está relacionado à presença de *C. trachomatis*³. Por

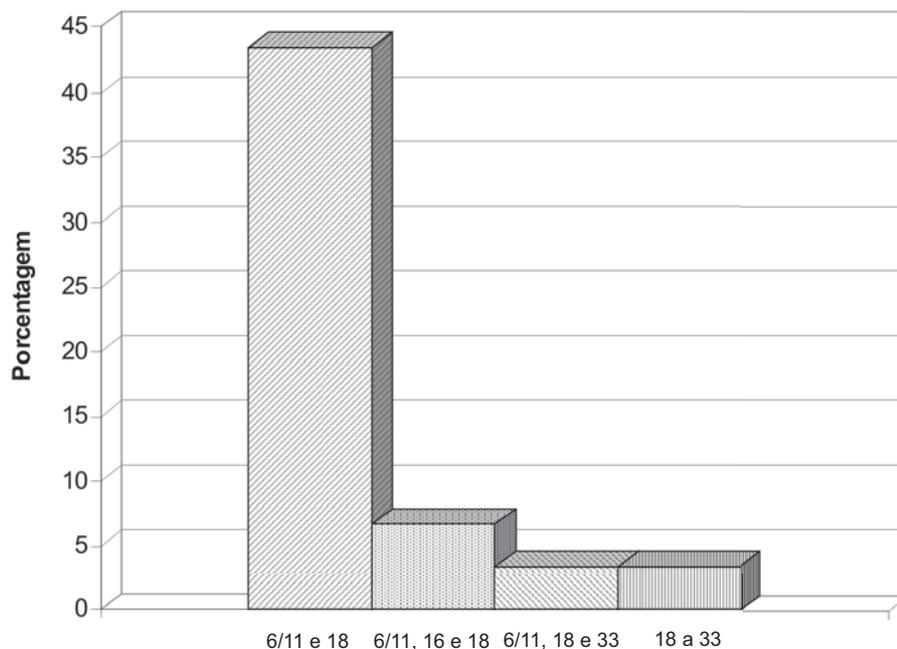


Figura 2. Prevalência de infecção mista de HPV nas lesões genitais HPV induzidas incluídas no estudo.

outro lado, mulheres que fizeram uso de contraceptivo de emergência possuem altos níveis de progesterona, o que aumenta 2,5 vezes o risco de infecção clamidiana¹⁴. Além disso, o uso de anticoncepcionais orais está relacionado com a presença de condiloma acuminado²¹, e atua conjuntamente com outros fatores como alterações genéticas e alguns tipos de HPV, na transformação de células e nas progressões das lesões intraepiteliais cervicais.²²

No presente estudo, o DNA-HPV foi detectado em todas as amostras de condiloma acuminado. Quanto ao genótipo viral envolvido nessas lesões, a literatura descreve que verrugas genitais são as lesões HPV induzidas mais comuns e que estão associadas aos HPV de baixo risco oncogênico, como os genótipos 6 e 11²³, os quais foram identificados com maior frequência neste estudo, representando 86,7% do total dos genótipos caracterizados, incluindo as infecções mistas. Sun *et al.*²³, estudando biópsias de pacientes com condiloma acuminado, detectaram genótipos 6 e/ou 11 em 92,2% das amostras. Entretanto, 63,4% das amostras apresentaram o genótipo viral 18, isoladamente ou concomitante a outro genótipo. Embora poucos trabalhos da literatura demonstrem a genotipagem de HPV em amostras de condiloma acuminado, nossos resultados enfatizam que esse grupo de pacientes pode estar em risco de apresentar carcinoma cervical, como sugerido anteriormente²⁴.

A infecção por mais de um tipo de HPV na mesma amostra foi de 56,7%. Em lesões precursoras do câncer cervical a incidência de infecção mista é cerca de 49%²⁵. Entretanto, ainda não é conhecido se a interação de genótipos diferentes de HPV pode servir como preditora para severidade da doença. Nesse sentido, Gargiulo *et al.*²⁵ avaliaram, retrospectivamente, a extensão da infecção simples ou múltipla de HPV entre mulheres com citologia anormal. Segundo esses autores, os resultados indicam que a detecção de infecção por múltiplos tipos de HPV não é preditor de câncer cervical em relação à infecção por tipo viral único e que a relevância dessa interação no progresso da doença ainda é desconhecida.

A positividade de *C. trachomatis* nesse estudo foi de 33,3% e é superior a prevalência da maioria dos estudos realizados^{2,4,13}. Lee *et al.*³ encontraram prevalência semelhante, porém em mulheres com ectopia cervical, e os autores sugerem que o rastreamento oportuno para *C. trachomatis* deveria ser realizado a fim de reduzir a prevalência dessa infecção e as suas sequelas. Muitos estudos na literatura têm mostrado a prevalência de diversas DST concomitantes^{9-12,26}, porém poucos avaliaram a associação entre condiloma e *C. trachomatis*, e essa relação ainda não foi encontrada²⁷. Há de se ressaltar que as complicações decorrentes da cervicite por *C. trachomatis* são severas e que na grande maioria das mulheres a presença de sinais e sintomas é rara. Assim, a busca ativa das infecções do trato genital inferior, quando possível, é sempre desejável, assim como o tratamento etiológico dessas infecções.

CONCLUSÃO

A prevalência de infecção clamidiana em mulheres com condiloma acuminado é alta e a estratégia de rastreamento e tratamento da infecção clamidiana poderia ser incorporada na rotina ginecológica desse grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Política para o controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis no Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde. Brasília; PNDST/AIDS; 2001.
2. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kunt B, Meyer A, Wondra J, Strowitzki T, et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples. *Fertil Steril* 2003; 80(3): 660-663.
3. Lee V, Tobin JM, Foley E. Relationship of cervical ectopy to chlamydia infection in young women. *J Fam Plann Reprod Health Care* 2006; 32(2): 104-106.
4. Araújo RS, Guimarães EM, Alves MF, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FC, et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(6): 397-400.
5. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5): 433-447.
6. Blas MM, Canchihuaman FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect* 2007; 83(4): 314-318.
7. Kovács L, Nagy E, Berik I, Mészáros G, Deák J, Nyári T. The frequency and the role of *Chlamydia trachomatis* infection in premature labor. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 62(1): 47-54.
8. Rours IG, Hammerschlag MR, Ott A, De Faber TJ, Verbrugh HA, de Groot R, et al. *Chlamydia trachomatis* as a cause of neonatal conjunctivitis in Dutch infants. *Pediatrics* 2008; 121(2): 321-326.
9. Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, et al. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(2): 88-93.
10. Joyee AG, Thyagarajan SP, Reddy EV, Venkatesan C, Ganapathy M. Genital chlamydial infection in STD patients: It's relation to HIV infection. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23(1): 37-40.
11. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185(3): 324-331.
12. Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA* 2004; 291(18): 2229-2236.
13. Tábora N, Zelaya A, Bakkers J, Melchers WJ, Ferrera A. *Chlamydia trachomatis* and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(1): 50-53.
14. Brabin L, Fairbrother E, Mandal D, Roberts SA, Higgins SP, Chandio S, et al. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus, and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect* 2005; 81(2): 128-132.
15. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43(4): 277-281.
16. Fagundes LJ, Patriota RCR, Gotlieb SLD. Avaliação da demanda no Ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis do CS Geraldo de Paula Souza-Faculdade de Saúde Pública-USP, Brasil, no período de 1994 a 1998. *An Bras Dermatol* 2001; 76(2): 223-232.
17. Vela RAR, Poletini J, Marques MEA, Stolf HO, Candeias JMG, Silva MG, Costa ALB, Matsuo CY, Miot HA. Detecção e genotipagem de papilomavirus humano em lesões de queratoacantoma solitário de pacientes imunocompetentes. *An Bras Dermatol* 2006; 81(5): 443-448.
18. Vinayagamoorthy T, Mulatz K, Hodgkinson R. Nucleotide sequence-based multitarget identification. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3284-3292.

19. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders, PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3'ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt4): 1057-1062.
20. Van den Brule AJ, Meijer CJ, Bakels V, Kenemans P, Walboomers JM. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28(12): 2739-2743.
21. Kjaer SK, Tran TN, Sparen P, Tryggvadottir L, Munk C, Dasbach E, et al. The burden of genital warts: a study of nearly 70,000 women from the general female population in the 4 Nordic Countries. *J Infect Dis* 2007; 196(10): 1447-1454.
22. zur Hausen H. Papilloma viruses in human cancer. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111(6): 581-587.
23. Sun AH, Xu Y, Feng Y, Yan J. Study on the frequency of human papillomavirus type 6 and type 11 infection and L1 gene expression of the virus in biopsy samples of pointed condyloma patients. *Zhonghua Liu Xinh Bing Xue Za Zhi* 2006; 27(2): 150-153.
24. Tsuji K, Nakamura Y, Mori I, Tanaka M. Human papilloma virus infection in vaginal condyloma acuminatum. *Rinsho Byori* 2003; 51(2): 93-97.
25. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, et al. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007; 125(2): 176-182.
26. Hughes G, Catchpole M, Rogers PA, Brady AR, Kinghorn G, Mercey D, et al. Comparison of risk factors for four sexually transmitted infections: results from a study of attendees at three genitourinary medicine clinics in England. *Sex Transm Infect* 2000; 76(4): 262-267.
27. Wen LM, Estcourt CS, Simpson JM, Mindel A. Risk factors for the acquisition of genital warts: are condoms protective? *Sex Transm Inf* 1999; 75(5): 312-316.

Endereço para correspondência:**MARCIA GUIMARÃES DA SILVA**

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Distrito de Rubião Júnior s/n. Botucatu-SP

CEP: 18618-970

Tel: 55 14 3811-6238; Fax: 55 14 3811-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Recebido em: 11/04/2008

Aprovado em: 22/09/2008