

# Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano: revisão da literatura

Molecular methods for human papillomavirus detection: literature review

Flávia Castello Branco Vidal<sup>1</sup>

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento<sup>1,2</sup>

Cíntia Tereza Lima Ferraro<sup>4</sup>

Luciane Maria Oliveira Brito<sup>1,3</sup>

## Palavras-chave

Papilomavírus Humano  
Técnicas de Diagnóstico Molecular  
Determinação

## Keywords

Human papillomavirus  
Diagnostic Molecular Methods  
Determination

## Resumo

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus que infecta o epitélio cutâneo e das mucosas. Células infectadas por este vírus perdem a capacidade de controlar o ciclo celular e passam a proliferar descontroladamente gerando alterações displásicas que podem progredir para lesões malignas. Existem mais de 200 tipos de HPV e entre eles aqueles que apresentam maior ou menor risco de causar câncer. Dessa forma, o HPV pode ser classificado como sendo de baixo risco ou alto risco. Os métodos mais utilizados em pesquisa para análise molecular do HPV é a hibridização *in situ* (ISH), reação em cadeia da polimerase (PCR) que varia desde a PCR alelo específica, passando pelo tipo Nested e a PCR multiplex, e a mais nova técnica baseada na tecnologia de *microarray*. A maioria destes testes é realizada apenas em centros de pesquisa, e não rotineiramente na clínica. Por outro lado, o teste de captura híbrida II para HPV, baseado na hibridização do DNA, é comercialmente disponível. As técnicas para detecção do DNA do HPV e sua genotipagem variam quanto a sua sensibilidade e especificidade. Técnicas que utilizam sondas como a hibridização *in situ* e o *Southern blotting* são as menos sensíveis para detecção da sequência do DNA, enquanto que as mais sensíveis são as técnicas que utilizam a amplificação do DNA alvo, como a PCR e a qPCR. À medida que a tecnologia avança, as técnicas moleculares vão se aprimorando para a detecção do HPV. O objetivo final é desenvolver uma metodologia de baixo custo que apresente resultados rápidos e eficientes.

## Abstract

The human papillomavirus (HPV) is a virus that infects the skin and mucosal epithelium. Infected cells lost the ability to control cell cycle and begin to proliferate uncontrollably causing dysplastic alterations that can progress to malignant lesions. There are over 200 types of HPV with higher or lower risk of causing cancer. Thereby, HPV can be classified as high risk or low risk. The methods used in research for molecular analysis of HPV is the *in situ* hybridization (ISH), polymerase chain reaction (PCR) that varies from the allele specific PCR, Nested, PCR multiplex, and the newest technique based on *microarray* technology. Most of these tests are performed only in research centers, and not routinely in the clinic. An exception is the Hybrid Capture II test for HPV. The detection techniques of HPV and its genotyping vary in their sensitivity and specificity. Techniques that use probes, as *in situ* hybridization and *Southern blotting* are less sensitive for detection of DNA sequence, while the most accurate are the techniques based on DNA amplification, such as PCR and qPCR. As technology advances, molecular techniques become more accurate for the detection of HPV. The ultimate goal is to develop an inexpensive method to provide rapid and efficient results.

<sup>1</sup>Banco de Tumores e DNA da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – São Luís (MA), Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Patologia da UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina III da UFMA – São Luís (MA), Brasil.

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) – Rio de Janeiro, Brasil.

Endereço para correspondência: Flávia Castello Branco Vidal – Rua Coelho Neto, 311 – Centro – CEP: 65020-140 – São Luís (MA), Brasil –

E-mail: flavidal@hotmail.com

Conflito de interesse: não há.

## Introdução

### Biologia do papilomavírus humano e ciclo de vida

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus não envelopado com um capsídeo de 55 nm de diâmetro contendo uma dupla-fita de DNA com aproximadamente 8.000 pares de base (pb)<sup>1</sup> (D). O HPV infecta o epitélio cutâneo e das mucosas não só de humanos como da maioria dos seres do reino animal. Existem atualmente mais de 200 tipos de HPV sendo que novas linhagens são descobertas e adicionadas a esta lista<sup>1,2</sup> (D).

O ciclo de vida do HPV está intimamente relacionado com o processo de diferenciação e renovação do epitélio. O epitélio escamoso normal cresce como camadas estratificadas onde apenas as células da camada basal são capazes de proliferar, enquanto as células dos estratos superiores tornam-se diferenciadas e não proliferativas. Durante a renovação do epitélio, a célula basal se divide e uma das células-filhas migra para as camadas superiores do tecido iniciando sua diferenciação e interrupção do seu ciclo proliferativo, enquanto a outra célula-filha permanece na camada basal com fenótipo proliferativo perpetuando a linhagem. Células infectadas pelo HPV perdem a capacidade de controlar o ciclo celular mesmo quando diferenciadas<sup>3</sup> (D).

A entrada do HPV na célula ocorre através de microfissuras na camada basal do epitélio. O vírus penetra na célula, migra para o núcleo e permanece na forma episomal, ou seja, permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não integrado ao DNA da mesma. Após seu estabelecimento, o HPV inicia sua replicação na célula hospedeira chegando ao número de 50/100 episomos por célula<sup>2</sup> (D). À medida que a célula basal se divide, os episomos do HPV também são replicados e se distribuem entre as células-filhas (Figura 1).

Através de um processo ainda não conhecido, o HPV se integra ao DNA genômico da célula epitelial hospedeira e mediado por duas proteínas virais, E6 e E7, impede a parada do ciclo celular, mesmo das células diferenciadas que migram para as camadas mais superficiais do epitélio<sup>3</sup> (D) (Figura 1).

Existem mais de 200 tipos de HPV e, entre eles, aqueles que apresentam maior ou menor risco de causar lesões malignas. Dessa forma, o HPV pode ser classificado como sendo de baixo ou alto risco. A maioria dos vírus é de baixo risco e causam apenas verrugas benignas. O HPV-1, -2, -4 e -26 são alguns dos responsáveis pelas verrugas cutâneas comuns. HPV-6 e o -11 são geralmente os responsáveis pelo aparecimento das verrugas genitais (condiloma accuminata)<sup>1</sup> (D).

Os vírus HPV de alto risco são os responsáveis pelo aparecimento de lesões intraepiteliais que podem progredir

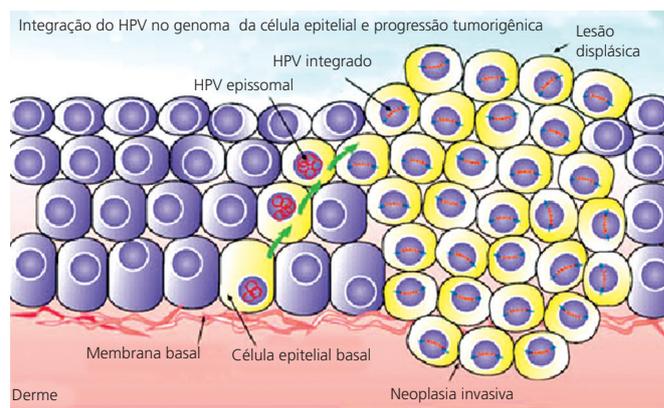
para carcinomas escamosos invasivos. Os principais tipos de HPV de alto risco envolvidos na oncogênese são os tipos 16, 18 e 31<sup>1-3</sup> (D).

### Associação da infecção pelo papilomavírus humano com as neoplasias epiteliais de células escamosas

É mundialmente reconhecida a estreita associação entre a infecção pelo HPV no colo do útero e o desenvolvimento do câncer cervical. Mais de 95% dos tumores cervicais estão associados às infecções pelos vírus HPV de alto risco, sendo o tipo 16 o mais prevalente, seguido pelos tipos 18 e 31<sup>1-3</sup> (D). Porém, novos dados vêm surgindo em relação à associação entre a infecção pelo HPV e o processo carcinogênico de tumores escamosos em outros sítios como cavidade oral, esôfago, pênis e canal anal, assim como a caracterização dos principais tipos de HPV presentes nestes tumores<sup>2,3</sup> (D).

## Metodologia

Este é um artigo de revisão da literatura no qual foram analisados alguns dos principais estudos sobre técnicas moleculares na detecção do HPV. Foram analisados estudos de 2000 a 2012 existentes no banco de dados da PubMed. A seleção foi feita baseada nos termos *molecular methods* e *HPV* ou *PCR* e *HPV*. Foram selecionados 27 artigos na PubMed sendo 7 revisões completas e 20 trabalhos experimentais. A seleção inicial foi baseada em seus títulos e resumos, e quando relacionados ao assunto buscou-se o texto completo. Deu-se prioridade a artigos mais recentes que expõem metodologias mais atualizadas sobre a detecção do HPV.



**Figura 1** - Ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV) no epitélio escamoso: o HPV pode apresentar-se na forma episomal ou integrado ao DNA da célula hospedeira. Integrado ao DNA, o vírus impede a parada do ciclo celular da célula epitelial ocasionando dessa forma o aparecimento de lesões displásicas que podem progredir para neoplasias invasivas. Adaptado de Immunopaedia<sup>4</sup> (D).

## Discussão

### Técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano

Estão disponíveis atualmente diferentes técnicas moleculares para detecção do HPV que variam quanto a sua sensibilidade e especificidade<sup>5</sup> (D). Os métodos mais utilizados em pesquisa para análise molecular de HPV é a hibridização *in situ* (ISH), reação em cadeia da polimerase que varia desde a PCR alelo específica, passando pelo tipo Nested e a PCR multiplex, e a mais nova técnica baseada na tecnologia de *microarray*<sup>6,7</sup> (B, A).

Grandes empresas como a Roche comercializam *kits* prontos para detecção de HPV baseados na técnica de PCR e *array* como os *kits* AMPLICOR HPV Test e Linear Array HPV Genotyping Test. A principal diferença entre os dois *kits* é a de que o primeiro detecta 13 tipos de HPV de alto risco, enquanto o segundo detecta tanto os tipos de alto risco detectados pelo primeiro como também alguns tipos de baixo risco, totalizando 37 tipos de HPV que podem ser detectados<sup>6,8</sup> (B, D).

Clinicamente, o teste molecular para detecção do HPV mais utilizado é o de captura híbrida II (Digene Diagnostics, Gaithersburg, MD, EUA). Este teste é baseado em sondas de RNA específicas para 13 tipos de HPV de alto risco e 5 tipos de baixo risco. O resultado não especifica o tipo de HPV, apenas indica se a amostra é positiva ou negativa e, se positiva, indica se o vírus é de baixo ou alto risco<sup>9</sup> (B).

Para realização das técnicas moleculares supracitadas, é necessária primeiramente a extração do DNA da amostra de interesse. As fontes de amostra para detecção do HPV podem variar de acordo com o estudo, se prospectivo ou retrospectivo. Podem ser derivadas de amostras incluídas em parafina ou provenientes de material fresco, como tecidos congelados e células coletadas pela utilização de *swabs* e escovas. As amostras incluídas em parafina são mais difíceis de serem analisadas devido ao estado de degradação do DNA que é maior quando comparado ao DNA de amostras frescas, nas quais o DNA se encontra mais íntegro<sup>10</sup> (D). Além disso, são necessárias etapas adicionais que precedem a extração do DNA de material incluído em parafina, como a desparafinização. Essa etapa consiste na retirada da parafina que envolve a amostra para que a enzima e o tampão de digestão possam penetrar eficientemente no tecido.

A técnica de PCR é a mais utilizada para detecção do DNA do HPV e é considerado o método mais sensível para a detecção do DNA viral em espécimes clínicos<sup>5,11-13</sup> (D, A, B, A). Em comparação ao método de captura híbrida, estudos demons-

tram uma especificidade que varia de 78,3 a 93% para captura híbrida e 92.8 a 100% para a PCR<sup>14-17</sup> (A). A PCR permite a replicação *in vitro* do DNA viral para que sejam geradas cópias suficientes para detecção e análise<sup>9</sup> (D). Os *primers* mais utilizados nos estudos são os pares MY09/11, GP+5/+6 e o par de *primer* PGMY09/11 que consiste em um melhoramento do *primer* MY09/11<sup>18</sup> (A). Todos estes *primers* são comuns para a maioria dos tipos de HPV, pois são derivados do gene da proteína L1 viral, uma proteína encontrada no capsídio dos vírus. Os *primers* MY09/11 e PGMY09/11 possuem 450 pb e o *primer* GP+5/+6, 190 pb.

As técnicas de PCR utilizadas para detecção do DNA viral na amostra em questão podem variar bastante. Existe a PCR convencional na qual se utiliza um dos pares de *primers* citados acima para detecção do HPV; pode ser do tipo Nested que constitui duas PCR consecutivas utilizando dois pares de *primers*, geralmente MY09/11 ou PGMY09/11 na primeira reação de PCR, e GP+5/+6 na segunda reação. Essa é a técnica mais sensível e muito utilizada em amostras que apresentam pouca quantidade de DNA, como *swabs* orais, ou em amostras com o DNA comprometido, como àquelas derivadas de tecidos parafinados<sup>10,18,19</sup> (D, A, A). Porém, devido sua alta sensibilidade, está muito sujeita a contaminação. Dessa forma, são necessários cuidados adicionais para sua realização assim com a utilização de controles rigorosos<sup>9</sup> (B).

A visualização dos produtos amplificados da reação de PCR é feita através de eletroforese tanto em gel de agarose como em gel de poliacrilamida. A eletroforese em gel de agarose possui a grande vantagem de ser uma técnica rápida e fácil, diferente da eletroforese em gel de poliacrilamida que é uma técnica mais trabalhosa e que utiliza mais reagentes para sua confecção. Porém, o gel de poliacrilamida possui uma resolução superior ao gel de agarose com a capacidade de separação de fragmentos menores de DNA<sup>20</sup> (A).

A técnica de ISH é empregada para detecção e localização do HPV na célula infectada. Consiste na hibridização (ligação) de uma sonda específica (sequência curta de DNA) para um tipo de HPV, por exemplo, tipo 16, em uma lâmina com tecido previamente preparado com tampões específicos. Através de uma reação de peroxidase, é possível a visualização de pontos amarronzados no núcleo celular indicando a presença do HPV. A técnica de ISH para HPV é utilizada principalmente para corroborar resultados positivos da reação de PCR com a vantagem de fornecer a localização do HPV na célula. Porém é uma técnica com baixa sensibilidade e com protocolos que tomam bastante tempo do pesquisador para sua confecção<sup>21</sup> (D). Alguns pesquisadores utilizam a forma de marcação do HPV

na hibridização como um indicador indireto de integração ou não do HPV ao DNA da célula<sup>22</sup> (A). A marcação pontual indica integração do vírus ao DNA da célula, já a marcação difusa aponta a forma episomal do vírus. Porém, o método ideal para análise da integração do HPV ao DNA celular é a técnica de PCR inversa (rli PCR). Diferentes tipos virais, como o HPV, se integram randomicamente no DNA genômico humano. A reação da polimerase inversa é especialmente útil para a determinação do sítio onde ocorreu a inserção do DNA viral<sup>23,24</sup> (A).

O número de cópias do DNA viral pode ser determinado por PCR em tempo real, também denominada de PCR quantitativa (qPCR)<sup>21,25</sup> (D, A). Nesta técnica são utilizadas sondas fluorescentes que podem ser quantificadas à medida que a amplificação vai ocorrendo, sendo diretamente proporcional à quantidade de *amplicons* gerados. É considerado o método mais preciso para estimar a carga viral<sup>10</sup> (D).

### Sensibilidade versus especificidade

O nível de sensibilidade de uma técnica é definido pela sua capacidade de detecção da menor quantidade possível de DNA. A especificidade determina o nível de acurácia de um ensaio, ou seja, quanto menor a quantidade de falsos-positivos e falsos-negativos da técnica, melhor sua acurácia<sup>21</sup> (D).

Técnicas que utilizam sondas como a hibridização *in situ* e o *Southern blotting* são as menos sensíveis para detecção da sequência do DNA, enquanto que as mais sensíveis são as técnicas que utilizam a amplificação do DNA alvo, como a PCR e a qPCR. Por exemplo, o teste de captura híbrida necessita de uma concentração mínima de 1,0 pg do alvo/mL ou cerca de 120.000 partículas virais. Já a técnica de qPCR detecta amostras com menos de cinco cópias virais<sup>21</sup> (D).

### Genotipagem do papilomavírus humano

A genotipagem, ensaio que caracteriza o tipo de HPV, pode ser realizada por diferentes técnicas como a hibridização reversa, a PCR *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), PCR alelo específica e o sequenciamento. A hibridização reversa é uma técnica na qual o produto amplificado é hibridizado com oligonucleotídeos específicos para variados tipos de HPV imobilizados em uma membrana de nylon. Através da ligação do produto amplificado a estes oligonucleotídeos, é possível detectar o tipo de HPV<sup>21</sup> (D).

A PCR-RFLP consiste na quebra enzimática (digestão) do DNA viral após amplificação, em uma sequência nucleotídica específica realizada por enzimas de restrição. O produto dige-

rado ou não digerido é posteriormente visualizado por gel de agarose e de acordo com banda observada, é possível determinar o tipo viral<sup>5</sup> (D).

Na PCR alelo específica, diferentemente da PCR convencional que utiliza um *primer* comum a todos os tipos virais, utiliza *primers* específicos para detecção de um determinado tipo de HPV<sup>13,17</sup> (A).

O *microarray* é uma técnica que consiste na incubação do produto da PCR em um *chip* contendo 22 tipos diferentes de sonda para 15 tipos de HPV de alto risco e 7 de baixo risco. A sensibilidade é alta (94,9%) e discrimina o genótipo do HPV assim como a presença de coinfeções<sup>5</sup> (D). Porém, este método requer a utilização de equipamentos de custo elevado.

Apesar de eficientes, as técnicas supracitadas têm uma limitação quanto aos tipos virais que podem ser caracterizados. Este fato não ocorre com o sequenciamento que é capaz de identificar desde os tipos mais comuns até os mais raros de HPV. Nesta metodologia são utilizados *kits* de sequenciamento e posteriormente a sequência nucleotídica adquirida é comparada em um banco genético utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). É uma técnica rápida, porém cara. Além disso, é deficiente na identificação de coinfeções<sup>5</sup> (D).

Além das técnicas diretas para detecção do DNA do HPV, existem também técnicas indiretas como a imunomarcagem para a proteína do ciclo celular p16. A proteína p16 é superexpressa em células infectadas pelo HPV. Porém, sua utilização como biomarcador não é verdadeira para todos os tipos de tecidos infectados pelo HPV. É demonstrada em diversos estudos a relação verdadeira entre superexpressão de p16 e presença de HPV em tumores cervicais, porém, esta associação não foi encontrada em tumores de cabeça e pescoço<sup>3</sup> (D).

## Conclusões

A incidência global de infecção por HPV em tumores epiteliais escamosos pode variar entre estudos. Esta variação depende de vários fatores, como características geográficas da população, preparação da amostra e utilização de diferentes métodos de detecção molecular do vírus. A sensibilidade e a especificidade entre os testes para detecção de HPV variam muito. À medida que a tecnologia avança, as técnicas moleculares vão se aprimorando na detecção do HPV. O objetivo final é desenvolver uma metodologia de baixo custo que apresente resultados rápidos e eficientes.

## Leituras suplementares

- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451-60.
- Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol.* 2006;16(2):83-97.
- Ferraro CTL, Canedo NHS, Oliveira SP, Carvalho MGC, Dias EP. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47(4):451-9.
- Immunopaedia.org [Internet]. Knowledge and research in the field of HIV paediatric immunology and immunology in general in South Africa [cited 2012 Nov. 10]. Available from: <http://www.immunopaedia.org.za/index.php?id=800>.
- Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers.* 2009;24(4):215-22.
- Farshadpour F, Konings S, Speel EJ, Hordijk GJ, Koole R, van Blokland M, et al. Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a case-control study regarding tobacco and alcohol consumption. *Patholog Res Int.* 2011;2011:806345.
- Ritari J, Hultman J, Fingerroos R, Tarkkanen J, Pullat J, Paulin L, et al. Detection of human papillomaviruses by polymerase chain reaction and ligation reaction on universal microarray. *PLoS One.* 2012;7(3):e34211.
- Roche.com [Internet]. LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test [cited 2012 Nov. 10]. Available from: <http://molecular.roche.com/assays/Pages/LINEARARRAYHPVGenotypingTest.aspx>.
- Davies P, Kornegay J, Iftner T. Current methods of testing for human papillomavirus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001;15(5):677-700.
- Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):80-8.
- Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):2036-43.
- Madsen BS, van den Brule AJ, Jensen HL, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for squamous cell carcinoma of the penis--population-based case-control study in Denmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(10):2683-91.
- Scheiner MA, Campos MM, Ornellas AA, Chin EW, Ornellas MH, Andrada-Serpa MJ. Human papillomavirus and penile cancers in Rio de Janeiro, Brazil: HPV typing and clinical features. *Int Braz J Urol.* 2008;34(4):467-74; discussion 475-6.
- Davis-Devine S, Day SJ, Freund GG. Test performance comparison of inform HPV and hybrid capture 2 high-risk HPV DNA tests using the SurePath liquid-based Pap test as the collection method. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(1):24-30.
- Huang SL, Chao A, Hsueh S, Chao FY, Huang CC, Yang JE, et al. Comparison between the Hybrid Capture II Test and an SPF1/GP6+ PCR-based assay for detection of human papillomavirus DNA in cervical swab samples. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1733-9.
- Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Rys J, Kope J, Daszkiewicz E. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochim Pol.* 2006;53(3):603-7.
- Weynand B, Delvenne P, Polet R, Guiot Y, Arafa M, Somja J, et al. Validation of ThermoFisher's Papsin for human papillomavirus detection in cervicovaginal specimens using PCR with GP5+/GP6+ primers and the Hybrid Capture II assay. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(6):671-5.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-61.
- Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, et al. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer.* 2009;9:440.
- Brahmasandra SN, Burke DT, Mastrangelo CH, Burns MA. Mobility, diffusion and dispersion of single-stranded DNA in sequencing gels. *Electrophoresis.* 2001;22(6):1046-62.
- Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(8):940-5.
- Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer.* 2012;7:4.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1755-62.
- Raybould R, Fiander A, Hibbitts S. Human papillomavirus integration and its role in cervical malignant progression. *Open Clin Canc J.* 2011; 5:1-7.
- Zhao Q, Modis Y, High K, Towne V, Meng Y, Wang Y, et al. Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. *Virol J.* 2012;9:52.