

Genotipagem de Papilomavírus Humano em Mulheres com Papanicolau Alterado

Genotyping of Human Papillomavirus in Women with Abnormal Pap Smears

Sulani Silva de Souza¹

ORCID: 0000-0001-6776-6906

Mirian Helena Hoeschl Abreu²

ORCID: 0000-0002-1303-0140

Roberta Moreira Paiva Ceribelli³

ORCID: 0009-0006-7508-6090

Paula Cristina Nogueira da Silva⁴

ORCID: 0009-0008-9429-077X

Gina Camilo de Oliveira⁵

ORCID: 0009-0008-1585-6238

Mariana Matos Roll⁵

ORCID: 0000-0002-3405-4168

¹ Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF) e Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS). Brasília. Distrito Federal. Brasil.

² Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) e Centro Universitário Euro-americano (UNIEURO). Brasília. Distrito Federal. Brasil.

³ Hospital Regional de Taguatinga (HRT). Brasília. Distrito Federal. Brasil.

⁴ Hospital Regional de Sobradinho (HRS) e Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS). Brasília. Distrito Federal. Brasil.

⁵ Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF). Brasília. Distrito Federal. Brasil.

RESUMO

Objetivo: avaliar a frequência e relação do papilomavírus humano (HPV) com a citologia vaginal alterada. **Método:** foram selecionadas 319 mulheres com 25 anos ou mais com citologia alterada e submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Resultado: as amostras foram divididas em dois grupos, sem e com tratamento cervical prévio. A frequência de HPV positivo foi de 71% e 47%, respectivamente. Os HPVs de alto risco predominantes foram: 16, 58, 52 e 53. O HPV16 e infecção múltipla foram mais prevalentes entre 25 e 35 anos. A lesão intraepitelial de alto grau se associou com o HPV16 nos dois grupos e com o HPV53 no grupo com tratamento.

Conclusão: a alta prevalência de HPV nas amostras, a persistência do HPV16 e a associação do HPV53 e infecções múltiplas devem ser consideradas para a realização de genotipagem a fim de identificar as lesões precocemente.

Palavras-chave: Papilomavírus Humanos; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Citologia.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the frequency and relationship of human papillomavirus (HPV) with altered vaginal cytology. **Method:** 319 women aged 25 years or older with altered cytology were selected and submitted to real-time polymerase chain reaction technique.

Results: the samples were divided into two groups without and with previous cervical treatment. The frequency of HPV positive was 71% and 47%, respectively. The predominant high-risk HPVs were: 16, 58, 52 and 53. HPV16 and multiple infection were more prevalent between 25 and 35 years of age. High-grade intraepithelial lesions were associated with HPV16 in both groups and HPV53 in the treatment group. **Conclusion:** the high prevalence of HPV in the samples, the persistence of HPV16, and the association of HPV53 and multiple infections should be considered for genotyping to identify lesions early.

Keywords: Human Papillomavirus Viruses; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Cytology.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo mais comum para a mulher no mundo, sendo o papilomavírus humano (HPV) o principal agente causal para o seu desenvolvimento¹. Em países desenvolvidos, a mortalidade e incidência têm sido reduzidas entre 80-90% com o emprego de rastreamento adequado e vacinação com cobertura populacional². No Brasil, este câncer ocupa a terceira posição de importância, estimando-se 17.010 casos novos a cada ano do biênio 2023-25, com risco estimado de 15,38 casos por 100 mil mulheres. Na região Centro-Oeste ocupa a terceira posição com risco estimado de 16,66 casos por 100 mil mulheres³. Esta doença tem grande impacto social e econômico, uma vez que afeta a mulher em idade relativamente jovem e tem grande prevalência em regiões menos desenvolvidas do mundo. O emprego de técnicas adequadas de rastreamento é fundamental para o seu controle e a implantação de intervenções na saúde pública de forma efetiva.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) para acelerar a eliminação da doença como problema de saúde pública as seguintes metas devem ser alcançadas até 2030: 1) aos 15 anos 90% das meninas totalmente vacinadas contra HPV; 2) aos 35 e 45 anos 70% das mulheres submetidas a um teste de rastreamento de alta performance; e 3) tratamento para 90% das mulheres identificadas com lesões precursoras e câncer⁴.

Em 2021 foram realizados mais de cinco milhões de exames citopatológicos cérvico-vaginais pelo Sistema Único de Saúde (SUS), também conhecido pelo método Papanicolau. Entretanto, estudos mostram que a sensibilidade desse método é baixa e passível de diversos problemas de coleta e processamento. O rastreio primário utilizando testes moleculares para HPV se mostra como uma possível alternativa para melhorar a acurácia relacionada ao diagnóstico precoce. Segundo Teixeira et al.(2022)⁵, aproximadamente 20% das citologias coletadas em mulheres acima de 25 anos e 60% dos cânceres de colo cervical são diagnosticados em estágios avançados mesmo nas regiões mais desenvolvidas do Brasil.

O papilomavírus humano (HPV) é um DNA vírus circular não envelopado transmitido por meio de contato físico direto, podendo infectar também a pele e mucosa. Esse vírus pode estar associado ao aparecimento de verrugas ou câncer. Existem mais de 200 tipos de HPV, sendo 15 de alto risco oncogênico. São mais frequentemente apresentados na seguinte ordem 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35 segundo Small et al.

(2017)⁶. O HPV pode aparecer como uma infecção simples ou múltipla, uma vez que a resposta imune do hospedeiro para a infecção é variável. O HPV16 pode estar associado com aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical invasivo⁶.

O método de Papanicolau tem sido utilizado para o rastreamento do câncer cervical por mais de 50 anos. É um sistema que classifica as alterações citológicas de I a V de acordo com a perda da maturação citoplasmática das células cervicais e atipias citológicas (figuras mitóticas anormais e alterações no tamanho e forma do núcleo). Estas categorias podem corresponder, no sistema Bethesda⁷ a: (I) negativo para lesões intraepiteliais e malignidade (NILM); (II) a célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASCUS); (III e III d) a lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), (IV) a lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e (V) câncer *in situ* (AIS).

A classificação entre normal e lesões *borderlines* pode apresentar grande variação entre os avaliadores. Assim, o cálculo da sensibilidade deste método é difícil e dependente de quem realiza a coleta e da repetição do exame em intervalos regulares⁸, podendo variar de 51% a 76% nas lesões de alto grau. Esta técnica é muito trabalhosa e necessita de uma graduação de leve, moderada e severa na discarose. Histologicamente, o LSIL corresponde a neoplasia intraepitelial de baixo grau I (NIC I) e o HSIL a neoplasia intraepitelial tipo II e III (NIC II e NIC III). A citologia identifica a lesão cervical quando o tratamento é potencialmente curativo⁹. Os principais problemas estão relacionados com a coleta e a interpretação dos achados. Segundo Bhatha et al.(2020)¹⁰ a citologia possui baixa sensibilidade como método de rastreio, com aproximadamente 53%, enquanto os testes de HPV possuem 96,1%, apesar da sua menor especificidade (90,7% versus 96,3%).

O teste de genotipagem de HPV é um método mais objetivo e quando bem estabelecido consegue diferenciar resultado positivo ou negativo. Tem alta sensibilidade para o teste positivo e alto valor preditivo negativo para o teste negativo, mas baixa especificidade. Assim, identifica com segurança a mulher que necessita de ampliar a sua investigação em relação àquela que poderá retornar para a rotina do rastreamento. Tem sido empregado: 1) na triagem de lesões anormais de baixo grau encontradas na citologia, antes do encaminhamento para a colposcopia; 2) na triagem primária do câncer de colo uterino; 3) na avaliação de cura após tratamento e 4) no seguimento de mulheres com citologia e/ou teste de HPV positivo, mas sem lesão histológica

relevante. Quando utilizado como teste primário necessita de um segundo exame, a citologia, para os casos positivos. Desta forma, um maior número de neoplasia intraepitelial escamosa de alto grau poderá ser detectado comparado à citologia convencional¹¹⁻¹².

Devido à alta prevalência da infecção de HPV na população jovem e baixa naquela com mais de 50 anos, preconiza-se a realização do teste HPV em mulheres com mais de 30 anos¹³⁻¹⁴. Ele pode identificar a presença do vírus antes do estabelecimento das lesões. Segundo revisão sistemática publicada por Koliopoulos et al.(2017)⁷, a triagem de câncer cervical baseada em teste de HPV reduziu a perda de casos de neoplasia intraepitelial cervical tipo 2 e 3 em casos histologicamente confirmados comparado à citologia, e o resultado negativo foi tranquilizador considerando o alto valor preditivo negativo.

Neste contexto, este estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade da técnica molecular de genotipagem e avaliar a associação dos achados citológicos anormais e a distribuição dos diferentes genótipos do HPV, especialmente alto risco. Secundariamente, a concomitância das infecções únicas e múltiplas.

MÉTODO

Trata-se de um estudo clínico realizado em 319 mulheres atendidas em três hospitais do Distrito Federal. Para tanto, foi obtido termo de consentimento informado de todas as participantes e o projeto foi aprovado sob o número 26454919.1.0000.5553 do Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Superior de Ciências da Saúde.

Os critérios de inclusão na pesquisa envolviam: mulheres com 25 anos de idade ou mais, convidadas pelo médico assistente, no período de agosto de 2022 a maio de 2024, com exame de Papanicolau alterado, classificado como: LSIL; ASCUS; ASCH; HSIL; AIS e atipias em células glandulares (AGC). A amostra foi dividida em dois grupos: a) Grupo 1: sem tratamento cervical prévio e b) Grupo 2: submetido a tratamento cervical prévio e em programa de seguimento, com amostras coletadas após a conclusão do procedimento terapêutico. A coleta do material cervical foi realizada pelo médico, utilizando material adequado e descartável fornecido pelo LACEN-DF, contendo meio de transporte líquido, e armazenado à temperatura ambiente ou geladeira (4 a 8°C). As amostras colhidas foram encaminhadas ao Núcleo de Virologia do

Laboratório Central (LACEN-DF) acompanhadas de requisição médica com a indicação clínica.

As amostras coletadas eram transferidas para tubos de congelamento e armazenadas. Quando um quantitativo de 44 amostras era atingido realizava-se a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real com a extração e amplificação do material coletado com o emprego de kits padronizados. A extração do material genético foi realizada por kit comercial, da *ZymoResearch*®(USA) em placa de 96 poços com 150 µL das amostras. A técnica de lise utilizou *MagBindingBeads* fornecidos pelo kit. A extração foi realizada no equipamento *ThermoScientific*®(USA) e a eluição do material genético realizada em 100 µL.

A amplificação foi realizada com o kit Anyplex® II HPV28 (Seegene, Coreia) que utiliza a tecnologia TOCE® para detectar multi-patógenos em um único canal de fluorescência. É um ensaio multiplex que permite à amplificação, detecção e diferenciação simultâneas de ácidos nucleicos de 19 e 9 tipos de HPV de alto (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) e baixo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70) risco, respectivamente; assim como do controle interno (CI).

A detecção do Anyplex® II HPV28 foi realizada por meio da análise de temperatura de *melting* que pode ser cíclica ou no ponto final. O CI é incorporado no produto como um controle de processo endógeno para monitorizar a extração de ácido nucleico e para verificar a possível inibição da reação em cadeia da polimerase (PCR). O CI é co-amplificado com ácidos nucleicos alvo dentro das amostras clínicas. A análise dos resultados foi realizada com o software do CFX96 Dx System® (CFX Manager Dx Software v3.1). De acordo com a carga viral representada por cruzes é possível classificar a detecção do patógeno: ausência (-) ou três (+++), duas (++) e uma (+) cruzes. O limite de detecção para sensibilidade é de 50 cópias/reação.

Foram calculadas as frequências dos tipos de HPV mais prevalentes e os com múltiplos genótipos, definidos por dois ou mais vírus. A associação entre as variáveis categóricas foi analisada com qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. A razão de chance foi determinada. O tamanho de efeito foi representado por Fi (ϕ), quando menor que 0,1, 0,3 e 0,5 foi considerado pequeno, médio e grande, respectivamente¹⁵. Foi considerado significante quando $p < 0,05$. Os dados foram armazenados no Microsoft Excel®. A análise estatística foi realizada com o software IBM SPSS Statistics® 29,0.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 319 mulheres. As regiões assistidas foram: Samambaia 84(26%), Taguatinga 54(17%), Brasília 33(10%), Recanto das Emas 28(9%), Sobradinho 21(7%), Planaltina 18(6%), Riacho Fundo 12(4%), Ceilândia 12 (4%), Gama 11 (3%), Santa Maria 10(3%), Paranoá 7 (2%), Guará 5(1,5%), São Sebastião 5 (1,5%) e Santo Antônio do Descoberto 3 (1%); outras regiões participantes foram: Águas Lindas de Goiás, Núcleo Bandeirante, Brazlândia, Cidade Ocidental, Cruzeiro, Formosa, Itapuã, Luziânia, Novo Gama e Valparaíso, entretanto com baixa representação no total de 16 casos (5%).

Foi realizada a genotipagem de todas as amostras, divididas em dois grupos: 177(55%) amostras Grupo 1 - sem tratamento cervical prévio, e 142 (45%) Grupo 2 - com tratamento cervical prévio e em programa de seguimento. Foi verificada associação entre a presença de HPV e o grupo avaliado ($\chi^2 (1) = 18,996$, $p \leq 0,001$; $\phi = 0,244$ [OR = 2,76; IC95% = 1,74 - 4,39]). Foram positivas para algum HPV 126 (71%) e 67 (47%) amostras dos Grupos 1 e 2, respectivamente. Das amostras positivas identificadas, 119 (67%), 37 (21%) foram positivas para HPV de alto e baixo riscos no Grupo I, respectivamente, e 63 (44%) e 15 (11%) foram positivas para HPV de alto e baixo riscos no Grupo II, respectivamente. No total 193 (61%) das amostras foram positivas para os tipos de HPV testados. Destas 108 (56%) e 85 (44%) foram positivas para um único e múltiplos tipos de HPV, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de HPV nas amostras e em infecções simples e múltiplas considerando a faixa etária e o grupo investigado. Distrito Federal, 2024.

Faixa etária (anos)	Grupo 1			Grupo 2			Total amostras (142) n(%)	
	HPV+ (126) n(%)	HPVúnico(65) n(%)	HPVmúlti(61) n(%)	Total amostras (177) n(%)	HPV+ (67) n(%)	HPVúnico(43) n(%)	HPVmúlti(24) n(%)	
25-35	33(85) ^a	14(36)	19(49) ^c	39(22)	16(43)	10(27)	6(16)	37(26)
35-45	50(75)	31(46) ^b	19(28)	67(38)	21(45)	15(32)	6(13)	47(33)
45-55	22 (63)	12(34)	10(28)	35(20)	16(43)	10(27)	6(16)	37(26)
55-65	16 (55)	6(21)	10(34)	29(16)	10(62)	6(37)	4(25)	16(11)
>65	5 (71)	2 (28)	3(43)	7(4)	4(80)	2(40)	2(40)	5(3)

n= número de amostras; papiloma vírus humano presente (HPV+); papiloma vírus humano simples (HPVúnico) e papiloma vírus humano múltiplo (HPVmúlti); sem tratamento cervical prévio (Grupo 1); com tratamento cervical prévio (Grupo 2). ^ap= 0,036; ^bp=0,04; ^cp= 0,034.

A mediana das idades foi 42 e 43; limite inferior 25 e 26 e limite superior 74 e 76, respectivamente, para os Grupos 1 e 2. As 319 amostras foram distribuídas em cinco grupos etários: 25 a 35 (24%), 36 a 45(36%), 46 a 55 (22%), 56 a 65 (14%) e maior que 65 (4%). Houve predomínio do grupo etário entre 36 e 45 anos conforme Tabela 1 para os dois grupos. A detecção de HPV positivo e infecções múltiplas teve associação com a faixa etária de 25 a 35 anos ($\chi^2 (1) = 4,398, p=0,036$; $\phi= 0,158$; $\chi^2 (1) =4,50, p=0,034$; $\phi= 0,159$). A infecção única se associou com a segunda faixa etária ($\chi^2 (1) =4,227, p=0,04$; $\phi= 0,155$). Houve associação entre o primeiro grupo etário e HPV16 para o Grupo 1 ($\chi^2 (1) = 9,710, p=0,002$; $\phi= 0,234$). Este grupo apresentou uma chance 3,30 (IC 95%: 1,5 - 7,17) maior de infecção pelo HPV16 (Tabela 2).

Todos os tipos de HPV investigados foram identificados nesta amostragem, exceto o subtipo 11. Dezenove HPV de alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82) e oito HPV de baixo risco (6, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70). Houve predomínio do tipo 16 (33%), seguido do tipo 58 (16%), 52 (15%) e tipo 53 (11%) para o Grupo 1, e tipo 16 (44%), seguido do tipo 58 (14%), tipo 52 (12%) e tipo 53 (10%) para o Grupo 2, considerando o alto risco. Para o baixo risco houve predomínio do tipo 6 (50%) e tipo 54 (50%) para o Grupo 1, e tipo 42 (33%), tipo 44 (33%) e tipo 54 (33%) para o Grupo 2.

Tabela 2. Genotipagem de papilomavírus humano de alto risco por faixa etária e grupo investigado. Distrito Federal, 2024.

Tipo	Grupo 1						Grupo 2					
	25-35 n(%)	36-45 n(%)	46-55 n(%)	56-65 n(%)	>65 n(%)	Tota l	25-35 n(%)	36-45 n(%)	46-55 n(%)	56-65 n(%)	>65 n(%)	Tota l
HPV16	16(40) *	14(35)	4(10)	5(12,5)	1(2,5)	40	4(18)	8(36)	4(18)	5(23)	1(5)	22
HPV18	1(9,1))	6(54,5))	3(27,3))	1(9,1)	0(0)	11	0(0)	2(50)	1(25)	1(25)	0(0)	4
HPV31	3(30)	4(40)	1(10)	1(10)	1(10)	10	0(0)	1(33,3)))	1(33,3)))	1(33,4)))	0(0)	3
HPV33	2(22,2))	2(22,2))	3(33,4))	1(11,1))	1(11,1))	9	0(0)	1(50)	0(0)	1(50)	0(0)	2
HPV35	3(30)	4(40)	2(20)	1(10)	0(0)	10	1(20)	0(0)	3(60)	0(0)	1(20)))	5
HPV39	2(40)	2(40)	1(20)	0(0)	0(0)	5	3(100)))	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3
HPV45	1(20)	3(60)	1(20)	0(0)	0(0)	5	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	1
HPV51	1(20)	2(40)	1(20)	1(20)	0(0)	5	2(100)))	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2
HPV58	6(33,3)	8(44,5)	2(11,1)	2(11,1)	0(0)	18	1(17)	3(50)	2(33)	0(0)	0(0)	6

2)))							
HPV5	1(20)	1(20)	0(0)	2(40)	1(20)	5	0(0)	0(0)	1(25)	2(50)	1(25)
HPV6	5(25)	8(40)	5(25)	1(5)	1(5)	20	3(43)	3(43)	0(0)	0(0)	1(14)
HPV5	0(0)	1(50)	1(50)	0(0)	0(0)	2	1(25)	1(25)	2(50)	0(0)	0(0)
HPV6	0(0)	1(25)	3(75)	0(0)	0(0)	4	1(50)	0(0)	1(50)	0(0)	0(0)
HPV6	1(20)	2(40)	1(20)	1(20)	0(0)	5	0(0)	3(60)	2(40)	0(0)	0(0)
HPV2	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
HPV5	1(7,6)	5(38,5)	3(23,1)	2(15,4)	2(15,4)	13	0(0)	2(40)	1(20)	1(20)	1(20)
HPV6	0(0)	0(0)	3(75)	1(25)	0(0)	4	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
HPV7	2(67)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)	3	2(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
HPV8	2(28,5)	3(43)	0(0)	2(28,5)	0(0)	7	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)
											1

Grupo 1= sem tratamento cervical prévio; Grupo 2= com tratamento cervical prévio, *p significativo (0,002)

Na Tabela 3, observa-se os tipos de HPV relacionados com o aparecimento de infecção única ou múltipla para os grupos analisados. No Grupo 1 houve associação significativa entre HPV53 (teste exato de Fischer, $p < 0,001$, $\phi = 0,343$), HPV58($\chi^2(1) = 12,607$, $p < 0,001$, $\phi = 0,267$), HPV68 (teste exato de Fisher, $p = 0,004$; $\phi = 0,235$), HPV51 (teste exato de Fisher, $p = 0,004$; $\phi = 0,235$), HPV31 (teste exato de Fisher, $p = 0,003$; $\phi = 0,234$), HPV52 ($\chi^2(1) = 9,200$, $p = 0,002$, $\phi = 0,228$), HPV35 (teste exato de Fisher, $p = 0,033$; $\phi = 0,183$), HPV16 ($\chi^2(1) = 5,523$, $p = 0,019$; $\phi = 0,177$) e infecção múltipla. Para o Grupo 2 houve associação significativa entre HPV16 ($\chi^2(1) = 17,713$, $p < 0,001$; $\phi = 0,353$) e HPV58 (teste exato de Fisher, $p = 0,027$; $\phi = 0,204$) e infecção única. A análise de razão de chance demonstrou que o HPV16 e HPV58 aumentaram 7,04 (IC95%:2,61-18,98) e 6,38 (IC95%: 1,18 - 34,32) vezes a chance de apresentar infecção única. Houve associação significativa entre o HPV53 (teste exato de Fisher, $p < 0,001$; $\phi = 0,424$), HPV59 (teste exato de Fisher, $p < 0,001$; $\phi = 0,378$), HPV73 (teste exato de Fisher, $p = 0,028$; $\phi = 0,265$), HPV56 (teste exato de Fisher, $p < 0,015$; $\phi = 0,264$), HPV68 (teste exato de Fisher, $p = 0,034$; $\phi = 0,220$) e HPV35 (teste exato de Fisher, $p = 0,034$; $\phi = 0,220$) e infecção múltipla.

Tabela 3. Genotipagem do papilomavírus humano de alto risco, infecção simples e múltipla nos grupos investigados. Distrito Federal, 2024.

Tipo	Grupo 1		Grupo 2					
	HPVúnico n(%)	p	HPVmulti n(%)	p	HPVúnico n(%)	p	HPVmulti n(%)	p
HPV16	20(50)	NS	20(50)	0,019	15(68)	<0,001	7(32)	NS
HPV18	4(36)	NS	7(64)	NS	2(50)	NS	2(50)	NS
HPV31	2(20)	NS	8(80)	0,003	2(67)	NS	1(33)	NS
HPV33	4(44)	NS	5(56)	NS	1(50)	NS	1(50)	NS
HPV35	3(30)	NS	7(70)	0,033	2(40)	NS	3(60)	0,034
HPV39	1(20)	NS	4(80)	NS	2(67)	NS	1(33)	NS
HPV45	1(20)	NS	4(80)	NS	0(0)	NS	1(100)	NS
HPV51	0(0)	NS	5(100)	0,004	2(100)	NS	0(0)	NS
HPV52	6(33)	NS	12(67)	0,004	3(50)	NS	3(50)	NS
HPV56	1(20)	NS	4(80)	NS	1(25)	NS	3(75)	0,015
HPV58	6(30)	NS	14(70)	<0,001	5(71)	0,027	2(29)	NS
HPV59	1(50)	NS	1(50)	NS	0(0)	NS	4(100)	<0,001
HPV66	2(50)	NS	2(50)	NS	1(50)	NS	1(50)	NS
HPV68	0(0)	NS	5(100)	0,004	2(40)	NS	3(60)	0,034
HPV26	0(0)	NS	1(100)	NS	0(0)	NS	0(0)	NS
HPV53	1(8)	NS	12(92)	<0,001	0(0)	NS	5(100)	<0,001
HPV69	3(75)	NS	1(25)	NS	1(50)	NS	1(50)	NS
HPV73	1(33)	NS	2(67)	NS	0(0)	NS	2(100)	0,028
HPV82	3(43)	NS	4(57)	NS	0(0)	NS	1(100)	NS

Papiloma vírus humano simples (HPVúnico) e papiloma vírus humano múltiplo (HPVmulti); sem tratamento cervical prévio (Grupo 1); com tratamento cervical prévio (Grupo 2). NS= não significante.

Dos 193 casos, 108 (56%), 56 (29%), 19 (10%), 7(4%) e 3 (1%) foram positivo para um, dois, três, quatro e cinco ou mais tipos de HPV, respectivamente. Dos tipos identificados foram observados de forma semiquantitativa com +/3+, 2+/3+ e 3+/3+, para os Grupos 1 e 2: 44 (35%), 88 (70%) e 46 (36%); 21 (31%), 49 (73%) e 9 (13%), respectivamente.

Na Tabela 4 observa-se a distribuição de acordo com a classificação citológica e a genotipagem do HPV dentro dos grupos. No Grupo 1 houve predomínio dos tipos citológicos ASCUS e HSIL; associação significativa entre HSIL e o HPV16 ($\chi^2(1) = 28,270$, $p= 0,001$; $\phi= 0,400$). A análise de razão de chance demonstrou que mulheres com HSIL apresentaram aumento de 7,06 vezes (IC95%: 3,27 -13,26) e com ASCUS redução de 74,4% de infecção por HPV16 (OR 0,256; IC95%: 0,074 - 0,88). No Grupo

2 houve predomínio de NILM e HSIL; associação significativa ASCH e HPV58 (teste exato de Fisher, $p = 0,013$; $\phi = 0,282$); HSIL e HPV53 (teste exato de Fisher, $p = 0,020$; $\phi = 0,252$) e HPV16 ($\chi^2(1) = 6,766$, $p = 0,009$; $\phi = 0,218$). A análise de razão de chance demonstrou que mulheres com NILM apresentaram redução de 65,4% de infecção por HPV16 (OR 0,346; IC95%: 0,136 - 0,878).

Tabela 4. Tipos citológicos, genotipagem e grupo investigado. Distrito Federal, 2024.

	Grupo 1				Grupo 2			
	HPV16 n(%)	HPV58 n(%)	HPV52 n(%)	HPV53 n(%)	HPV16 n(%)	HPV58 n(%)	HPV52 n(%)	HPV53 n(%)
AGC	1(2,5)	1(5)	0(0)	1(8)	1(4)	0(0)	0(0)	0(0)
ASCUS	3(7,5)	3(15)	5(28)	1(8)	0(0)	0(0)	2(33)	0(0)
ASCH	8(20)	7(35)	8(44)	5(38)	3(14)	3(43) ^c	0(0)	0(0)
HSIL	24(60) ^a	4(20)	5(28)	5(38)	7(32) ^b	0(0)	1(17)	3(60) ^d
LSIL	1(2,5)	4(20)	0(0)	1(8)	0(0)	1(14)	1(17)	0(0)
AIS	3(7,5)	1(5)	0(0)	0(0)	2(9)	0(0)	0(0)	0(0)
NILM	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	9(41)	3(43)	2(33)	2(40)
Total	40	20	18	13	22	7	6	5

Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL); células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS); células escamosas atípicas de significado indeterminado, sem afastar lesão de alto grau (ASCH); lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); atipias em células glandulares (AGC); lesão intraepitelial de alto grau com suspeita de invasão (AIS); negativo para lesão intraepitelial e malignidade (NILM); sem tratamento cervical prévio (Grupo 1); com tratamento cervical prévio (Grupo 2); ^a $p < 0,001$; ^b $p = 0,009$; ^c $p = 0,013$; ^d $p = 0,02$.

DISCUSSÃO

A genotipagem do papilomavírus humano (HPV) é um método importante a ser incluído no arsenal diagnóstico para detecção de lesões precursoras do câncer de colo uterino, pois é objetivo, amplia o tempo para o rastreamento e auxilia na identificação precoce de casos positivos evitando formas graves e de difícil controle.

Neste estudo observacional transversal, dois grupos foram avaliados: Grupo 1 - sem tratamento cervical prévio e Grupo 2 - com tratamento cervical prévio. Para o Grupo 1 os principais achados foram: a) Frequência de HPV positivo de 71%; os tipos de HPV observados de forma predominante foram o 16, 58, 52 e 53, para o alto risco e 6 e 54 para o baixo risco; b) O HPV53 mostrou associação significativa com infecção múltipla com tamanho de efeito médio, seguido do HPV58, HPV68, HPV51, HPV31,

HPV52, HPV35 e HPV16; c) A citologia classificada como HSIL esteve associada a aumento no HPV16 (tamanho de efeito médio) e ASCUS a redução de infecção pelo HPV16; d) Foi observado de forma semiquantitativa predomínio de infecção com 2+ e 3+, seja para o grupo com infecção única e múltipla.

Para o Grupo 2: a) Frequência de HPV positivo de 48%; os tipos de HPV observados de forma predominante foi o 16, 58, 52 e 53 para o alto grau e 42, 44 e 54 para o baixo grau; b) O HPV16 e HPV58 mostraram associação significativa com infecção única; enquanto o HPV53 e HPV59 (tamanho de efeito médio), seguidos do HPV73, HPV56, HPV68, HPV35 e infecção múltipla; c) A citologia classificada como HSIL esteve associada ao HPV16 e HPV53; enquanto ASCH esteve associado à infecção por HPV58 e NILM a redução de infecção pelo HPV16; d) Foi observado de forma semiquantitativa predomínio de infecção com 2+ e 1+, seja para o grupo com infecção única e múltipla.

Quando comparados com a literatura, os resultados são consistentes com os descritos por Camara et al. (2003)¹⁶, que observaram uma frequência de 62% de HPV positivo ao estudar 169 mulheres com resultado de citologia alterada. Embora tenham encontrado os tipos 16, 58, 31, 53, 18 e 33 como mais frequentes ao investigar 11 tipos de HPV. Miranda et al. (2012)¹⁷ relataram uma prevalência de 11% em 399 mulheres com citologia normal, na qual 12 tipos foram testados, sendo 16, 83 e 66 os de alto risco mais frequentes. Os dois estudos foram realizados com amostras do Distrito Federal e com o emprego datécnica de PCR com *primers* e genotipagem por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição e no primeiro estudo houve, ainda, a realização de sequenciamento automatizado. As discrepâncias com os estudos podem ser explicadas pelas metodologias moleculares desenvolvidas e executadas no laboratório (“in house”) e a seleção amostral diferente.

Segundo Bruni et al. (2010)¹⁸ a prevalência global de HPV para os cinco continentes foi estimada em 11,7% (IC95%: 11,6-11,7), embora a América Latina apresentasse uma prevalência de 16,1%. Para estes autores, os tipos de HPV mais frequentes foram 16, 18, 52, 31 e 58. Em relação aos tipos identificados neste estudo houve concordância. O tipo 16 foi o mais prevalente corroborando com estudos de todas as regiões brasileiras¹⁹⁻²⁰.

Colpani et al. (2020)²¹ relataram em uma revisão sistemática prevalência de HPV total de 28,41% (IC95% 22,71-28,32) e para HPV alto risco foi de 17,65% (IC95%

14,80–20,92). Entretanto, destacam que em populações de alto e baixo risco a prevalência total foi de 38,01% (IC95% 25,90–51,82) e 24,11% (IC95% 21,50–26,930), respectivamente, sendo as regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil representantes das primeiras, e as regiões Sul e Sudeste representantes das segundas. Assim, a amostra selecionada para o presente estudo não descreve a população estudada, uma vez que ela é enviesada. As diferenças entre as prevalências podem estar relacionadas à complexa interação que ocorrem entre o vírus, o ambiente e o indivíduo, e em especial no estudo presente com a seleção da amostra.

Em 108 (56%) e 85 (44%) das amostras, a infecção ocorreu com um e múltiplos tipos de HPV, respectivamente. A co-detecção ocorreu para outro HPVHR ou HPVLR ou HPVLR-HPVLR. Kops et al.(2021)²² relataram em estudo multicêntrico nacional uma prevalência de infecções múltiplas de 33%, entretanto, o grupo participante apresentava entre 16 e 25 anos. Luo et al.(2023)²³, em estudo com 20.059 mulheres, observaram uma distribuição bimodal nos extremos de idade dos HPV. Aquelas com HSIL e LSIL apresentaram mais infecções com múltiplos tipos de HPV, assim como para ASCUS, embora para o último não tenha sido estatisticamente significante e o tipo mais prevalente associado ao HSIL foi HPV16 para mulheres submetidas a *screening*.

Kim et al.(2021)²⁴ analisaram 1.967 mulheres com 11,9% de infecções múltiplas e observaram que o HPV 53 foi o tipo mais prevalente em infecções múltiplas seguido do HPV16, HPV58 e HPV52, e o HSIL o tipo citológico mais envolvido. No presente estudo, o grupo etário de 25 a 35 anos apresentou mais HPV16 e múltiplas infecções; o HSIL esteve associado com o HPV16 nos dois grupos e com o HPV53 no Grupo 2. A prevalência dos tipos de HPV associados à infecção múltipla concorda com o descrito por Kim et al. (2021)²⁴. Entretanto, no presente estudo, o número amostral foi pequeno e as mulheres participantes tinham histórico de alteração citológica. A não detecção deste padrão bimodal chama atenção para a alta detecção de genótipos em idade precoce e uma população com alta prevalência total de HPV.

Oyervides-Muñoz et al.(2020)²⁵, em estudo de 294 mulheres com citologia cervical alterada, observaram 59% de infecções múltiplas e alta carga viral naquelas com infecção persistente. Mulheres com citologia normal apresentaram menor carga viral de HPV16 quando comparadas àquelas com LSIL. Estes autores reforçam o achado em relação à carga viral observada no presente estudo, no qual as participantes apresentaram, predominantemente, carga viral de 2+ e 3+ considerando um total de 3+,

especialmente no Grupo 1. Se o processo de amplificação do material genético fosse dividido em três momentos, as participantes começariam a apresentar carga positiva desde o início, para algumas, e para outras no segundo terço do processo. Já para o Grupo 2 com a carga viral de 2+ e 1+, o vírus só foi detectado no segundo e último terço do processo. Assim, as amostras no Grupo 2 apresentaram menor carga viral. Entretanto, outros estudos são necessários.

Os achados do trabalho aqui descrito têm várias implicações importantes. Primeiramente, houve a incorporação dos testes moleculares para genotipagem pelo SUS divulgado no Diário Oficial²⁶. O Distrito Federal é o primeiro Laboratório Central Público que aplicou um método padronizado para a realização da genotipagem. Os resultados demonstram a importância da identificação do tipo de HPV e facilitam a orientação com mais propriedade das mulheres, conforme recomendação de Carvalho et al.(2022)²⁷, que publicaram fluxograma para o *screening* após a realização da genotipagem para HPV.

Este estudo apresenta fortalezas, incluindo a diversidade amostral, a aplicação do método molecular para a realização da genotipagem do HPV para a população do Distrito Federal, com kit incluso nas Recomendações nº 878 (Ministério da saúde)²⁸ para testagem molecular e detecção de HPV, rastreamento do câncer de colo de útero e auxílio no seguimento de mulheres que já tenham realizado algum procedimento.

Como limitações do estudo, citam-se a natureza transversal, vieses na seleção da amostra testada, subdivisão em dois grupos e a abrangência das regiões com cobertura para a realização da genotipagem. Estas limitações devem ser consideradas ao interpretar os resultados.

Baseando-se nos resultados são sugestões para futuras pesquisas: incluir uma amostragem maior para os grupos, avaliar o papel da carga viral e aumentar a área de abrangência. Estas investigações futuras podem ajudar a esclarecer a relação entre os tipos de HPV e aquelas na era após a vacinação, por exemplo.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os dois grupos diferem na frequência dos tipos de HPV e na chance de infecção única e múltipla. Lesões intraepiteliais de alto grau estiveram associadas ao HPV16 nos dois grupos. Este estudo demonstra informação adicional relativa à presença dos tipos de HPV e alerta para a realização precoce de procedimentos de baixa complexidade que podem mudar a história de vida de cada mulher. Apesar das limitações, os achados fornecem novas informações sobre os tipos de HPV prevalentes em parte do Distrito Federal e sugere que este seja um marco inicial para implantação deste método diagnóstico para a saúde da mulher com a intenção de promover a sua saúde. Os resultados destacam a importância deste método como ferramenta diagnóstica, uma vez que pode ser utilizado para refinar as estratégias de rastreamento, priorizando mulheres com risco aumentado de desenvolver lesões de alto grau ou para monitorar de perto aquelas em seguimento ambulatorial e detectar possíveis recidivas naquelas com histórico de citologia alterada.

REFERÊNCIAS

1. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *J Gynecol Oncol.* 2016;27(2): e21. doi:10.3802/jgo.2016.27.e21
2. Basu P, Mittal S, Bhadra Vale D, Chami Kharaji Y. Secondary prevention of cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018; 47:73–85. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.012
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. 2022. Rio de Janeiro:INCA; 2022. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
4. World Health Organization. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. Genebra: WHO; 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>
5. Teixeira JC, Bhadra D, Cirbia V, Campos S, Froes J. Articles Organization of cervical cancer screening with DNA-HPV testing impact on early-stage cancer

detection: a population-based demonstration study in a Brazilian city. *Lance Reg Health Am.* 2022; 5:100084. doi:10.1016/j.lana.2021.100084

6. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 2017 Jul 1;123(13):2404–12. doi:10.1002/cncr.30667
7. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PPL, Mustafa RA, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Syst Rev.* 2017 Aug 10;(8):CD008587. doi:10.1002/14651858.CD008587.pub2
8. Kitchener HC, Denton K, Soldan K, Crosbie EJ. Developing role of HPV in cervical cancer prevention. *BMJ.* 2013;347: f7921. doi:10.1136/bmj.f7921
9. Rizzo AE, Feldman S. Update on primary HPV screening for cervical cancer prevention. *Curr Probl Cancer.* 2018;42(5):507–20. doi:10.1016/j.currproblcancer.2020.100570
10. Bhatla N, Singhal S. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;65:98–108. doi:10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008
11. Leinonen MK, Nieminen P, Lönnberg S, Malila N, Hakama M, Pokhrel A, et al. Detection rates of precancerous and cancerous cervical lesions within one screening round of primary human papillomavirus DNA testing: Prospective randomised trial in Finland. *BMJ.* 2012 Dec 8;345:e7789. doi:10.1136/bmj.e7789
12. Ronco G, Giorgi Rossi P. Role of HPV DNA testing in modern gynaecological practice. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;47:107–18. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.08.002
13. Barroeta JE, Adhikari-Guragain D, Grotkowski CE. Cervical cancer screening in the era of HPV vaccination: A review of shifting paradigms in cytopathology. *Diagn Cytopathol.* 2017 Oct;45(10):903–14. doi:10.1002/dc.23714
14. Gravitt PE, Winer RL. Natural history of HPV infection across the lifespan: Role of viral latency. *Viruses.* 2017;9(10):E273. doi:10.3390/v9100273

15. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. New York: Routledge; 1988. doi:10.4324/9780203771587
16. Camara GNL, Cerqueira DM, Oliveira APG, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(7):879–83. doi:10.1590/S0074-02762003000700003
17. Miranda PM, Pitol BCV, Moran MS, Silva NNT, Felix PM, Lima-Filho JL, et al. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. *Genet Mol Res*. 2012;11(2):1752–61. doi:10.4238/2012.June.29.8
18. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, Sanjose S De. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-Analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12):1789–99. doi:10.1086/657321
19. Martins TR, Mendes De Oliveira C, Rosa LR, De Campos Centrone C, Rodrigues CLR, Villa LL, et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: Correlation to cytological data. *Virol J*. 2016;13:138. doi:10.1186/s12985-016-0594-3
20. Levi JE, Martins TR, Longatto-Filho A, Cohen DD, Cury L, Fuza LM, et al. High-risk HPV testing in primary screening for cervical cancer in the public health system, São Paulo, Brazil. *Cancer Prev Res*. 2019;12(8):539–46. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0076
21. Colpani V, Bidinotto AB, Falavigna M, Giozzi SP, Benzaken AS, Pimenta C, et al. Prevalence of papillomavirus in Brazil: A systematic review protocol. *BMJ Open*. 2016;6(11): e010173. doi:10.1136/bmjopen-2015-010173
22. Kops NL, Caierão J, Bessel M, Driemeyer J, Horvath C, Domingues CM, et al. Behavioral factors associated with multiple-type HPV genital infections: data from a cross-sectional study in young women in Brazil. *Reprod Health*. 2021;18(1):201. doi:10.1186/s12978-021-01244-2
23. Luo Q, Zeng X, Luo H, Pan L, Huang Y, Zhang H, et al. Epidemiologic characteristics of high-risk HPV and the correlation between multiple infections and

cervical lesions. *BMC Infect Dis.* 2023 Dec 1;23(1):667. doi:10.1186/s12879-023-08634-w

24. Kim M, Park NJY, Jeong JY, Park JY. Multiple human papilloma virus infections are associated with hsil and persistent hpv infection status in korean patients. *Viruses.* 2021;13(7): 1342. doi:10.3390/v13071342

25. Oyervides-muñoz MA, Pérez-Maya AA, Sánchez-Dominguez CN, Berlanga-garza A, Antonio-macedo M, Valdés-Chapa LD, et al. Multiple HPV infections and viral load association in persistent cervical lesions in Mexican women. *Viruses.* 2020;12(4):380. doi:10.3390/v12040380

26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria Sectics/MS nº 3, de 7 de março de 2024. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 de março 2024, Seção 1, pág 73. <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/portaria/2024/portaria-sectics-ms-no-3-de-7-de-marco-de-2024>

27. Carvalho CF, Teixeira JC, Bragança JF, Derchain S, Zeferino LC, Vale DB. Cervical cancer screening with HPV testing: Updates on the recommendation. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2022;44(3):264–71. doi:10.1055/s-0041-1739314

28. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relatório de recomendação nº 878: testagem molecular para detecção de HPV e rastreamento do câncer do colo do útero. Brasília, DF; 2024. <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2024/testagem-molecular-para-deteccao-de-hpv-e-rastreamento-do-cancer-do-colo-do-utero/view>