

# COMPARAÇÃO DE DOIS PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANOS EM ESFREGAÇOS CERVICAIS

## COMPARISON OF TWO PAIRS OF PRIMERS USED IN POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES IN CERVICAL SMEARS

Ivna M Magalhães<sup>1</sup>, Natalia Moysés<sup>2</sup>, Larissa A Afonso<sup>2</sup>, Ledy HS Oliveira<sup>3</sup>, Silvia Maria B Cavalcanti<sup>4</sup>

### RESUMO

**Introdução:** o câncer de colo de útero é a neoplasia mais frequente em mulheres de países em desenvolvimento. Grande parte desses casos é causada por infecção persistente com diferentes tipos de papilomavírus humano (HPV) classificados em alto e baixo risco de acordo com o potencial oncogênico. Atualmente, acredita-se que a melhor rotina de identificação e acompanhamento das lesões por HPV de forma a prevenir o câncer cervical é a combinação da técnica de Papanicolaou com a reação em cadeia por polimerase (PCR) na qual ocorre a amplificação de regiões conservadas do genoma viral, com uso de primers degenerados e em seguida identificação do tipo viral. O primer mais utilizado em todo o mundo é o MY09/11, com boa sensibilidade e especificidade. Recentemente, foi descrito na literatura um novo conjunto de primers consensuais denominado PGMY reformulando o primer MY e adicionando um novo primer HMBO visando diminuir perdas do MY (falso negativo). **Objetivo:** comparar os dois pares de primers, MY e PGMY, a fim de apontar aquele mais adequado para o rastreamento de infecções causadas por HPV no colo uterino pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Métodos:** avaliamos 116 amostras de esfregaços cervicais. Após a extração do DNA, a técnica de PCR foi realizada de acordo com os protocolos descritos na literatura. **Resultados:** através desse trabalho, observamos que o par de primers PGMY apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV quando comparado com o par de primers MY, além de melhores valores preditivos negativo e positivo. **Conclusão:** o novo par de primers PGMY, deve ser usado para substituir o par MY a fim de melhorar a detecção do DNA viral. **Palavras-chave:** Papilomavírus Humano, câncer cervical, reação em cadeia da polimerase, DST

### ABSTRACT

**Introduction:** cervical cancer is the most frequent neoplasia among the women of countries in development. Great part of those cases is caused by persistent infection with different types of Human Papillomavirus (HPV) classified as high and low risk, according to the risk of cervical cancer development. Nowadays, it is believed that the best identification routine and follow up of the lesions in order to prevent the malignant transformation is the combination of the technique of Papanicolaou with the polymerase chain reaction (PCR), in which the amplification of conserved areas of the viral genome occurs, with use of degenerate primers, followed by type identification. The degenerate primers MY 09/11 are used worldwide, presenting good sensibility and specificity. Recently, a new group of consensual primers denominated PGMY was described in the literature reformulating the primer MY and adding a new primer HMBO seeking to reduce losses of MY (false negative). **Objective:** compare two pairs of primers, MY and PGMY, to discover the most appropriate for the diagnosis of infections caused by HPV in the uterine cervix for the technique of Polymerase chain reaction. **Methods:** a hundred and sixteen samples from cervical smears were evaluated. After DNA extraction, the PCR was done according to the protocols described in the literature. **Results:** we observed that the primers pair PGMY presents better sensibility and specificity in the detection of DNA of HPV when compared to the primers pair MY, it also presents better negative and positive predictive values. **Conclusion:** the new primers pair PGMY should be used to substitute the pair MY to improve the detection of the viral DNA. **Keywords:** Human Papillomavirus, cervical cancer, polymerase chain reaction, STD

## INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres do mundo e o mais comum entre as mulheres de países em desenvolvimento<sup>1,2</sup>. No Brasil, estima-se o surgimento de 18.680 novos casos de câncer de colo de útero para o ano de 2008. Grande parte desses casos é causada por infecção persistente de diferentes tipos de papilomavírus humano (HPV)<sup>3</sup>.

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae*, são vírus exclusivamente epiteliotrópicos, infectando a camada basal do epitélio e mucosas através de microlesões e traumas<sup>4</sup>. Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados e dentre esses, 40 tipos diferentes são detectados no

trato anogenital<sup>2,5</sup> e classificados de acordo com o potencial carcinogênico. Cerca de 15 tipos de HPV são classificados como de alto risco oncogênico e 12 outros tipos são agrupados como HPV de baixo risco carcinogênico. Existem ainda, alguns tipos que apresentam risco desconhecido na patologia do câncer<sup>5</sup>.

A literatura mundial apresenta inúmeros trabalhos descrevendo como os maiores fatores de risco para infecção por HPV: gênero, idade, e atividade sexual, com alta taxa de infecção em mulheres sexualmente ativas com média de 25 anos de idade<sup>6</sup>. A prevalência de infecção por HPV é mais alta entre mulheres jovens e parece cair com idade crescente<sup>7</sup>.

A detecção e tratamento precoces de lesões pré-malignas causadas por HPV podem prevenir a progressão ao câncer<sup>4</sup>. Entretanto, a identificação e implantação de testes eficientes de diagnóstico virológico foram dificultadas pelo fato do HPV não poder ser cultivado em laboratório a partir de amostras clínicas como é feito com outros vírus, por seu caráter espécie-específi-

<sup>1</sup>Mestranda do Curso de Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense (UFF).

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPq do Curso de Graduação em Biomedicina da UFF.

<sup>3</sup>Professora Titular do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF.

<sup>4</sup>Professora Associada do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF.

co, que limita a propagação em modelos animais, e pelos testes imunológicos não serem adequados para a detecção destes vírus<sup>8</sup>. O diagnóstico das lesões sugestivas de infecções por HPV se restringiu primeiramente à citopatologia (teste Pap) e à histopatologia, até que foram desenvolvidos os métodos de biologia molecular capazes de detectar as seqüências do DNA do HPV no material clínico.

O teste de Papanicolaou (teste Pap) é um exame de triagem primário, barato e rápido, porém, possui algumas limitações na detecção de lesões precursoras do câncer cervical, apresentando uma taxa de 20-30% de resultados falso-negativos<sup>4</sup>. Além disso, as amostras inadequadas constituem cerca de 8% do total de amostras recebidas onde pode haver sangue, bactérias, leveduras e aglomeração de células que prejudicam a detecção de células anormais.

A PCR é uma técnica baseada na amplificação enzimática de segmentos específicos de DNA do HPV, através de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) e polimerização com enzimas (DNA – polimerase). O PCR realizado no diagnóstico do HPV pode ser de dois tipos: o PCR genérico que utiliza *primers* consensuais para detectar uma grande variedade de tipos de HPV em uma só amplificação. Os primers usados têm como alvo regiões conservadas do genoma viral, tal como a porção L1 do genoma que codifica proteína do capsídeo viral; e o PCR específico, usado na tipagem do vírus, pois se baseia nas variações presentes nos genes E6 e E7 de cada tipo de HPV, que apresentam variações nucleotídicas determinantes da patogenia viral.

## OBJETIVO

Neste trabalho, foi nosso objetivo determinar a sensibilidade e a especificidade de dois pares de *primers* consensuais a fim de apontar aquele mais adequado ao rastreamento de infecções causadas por HPV no colo uterino, pela técnica de reação em Cadeia da polimerase.

## MÉTODOS

**Amostras** - Esse estudo avaliou 116 espécimes de esfregaços de colo uterino provenientes do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Viroológico do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF. Estas amostras são provenientes de pacientes atendidas no Hospital Francisco da Cruz Nunes em Itaboraí durante os anos de 2004 e 2005 e no Hospital Moncorvo Filho da UFRJ em 2006 e 2007. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFF CEP CMM/HUAP nº 189/04.

**Diagnóstico citológico** - Todas as amostras foram submetidas à coloração pela técnica de Papanicolaou e classificadas como: normal, alterações reativas, ASCUS (atípias escamosas de significado indeterminado), LSIL (lesões intraepiteliais de baixo grau: NIC 1 e 2), HSIL (lesões intraepiteliais de alto grau: NIC 3/ carcinoma *in situ*) e carcinoma invasivo.

## Detecção de HPV pela PCR

**Extração do DNA** - As amostras foram imersas em 150µL de tampão de digestão (50mM Tris-HCl pH8,5; 10mM EDTA, 200µg/mL de proteinase K) durante 3 horas em banho-maria a

uma temperatura de 55°C. A seguir, foi feita a extração do DNA viral pela técnica do fenol – clorofórmio - álcool isoamílico

**Precipitação do DNA** - Cada amostra, processada como descrito anteriormente, recebeu uma solução de acetato de sódio 3M, pH 6,0, na proporção de 1/10 do volume da fase aquosa, e a seguir foi adicionado 2,5 do volume da fase aquosa de etanol absoluto. Fizemos uma homogeneização, por inversão, e as amostras foram mantidas a -20°C *overnight*. No dia seguinte, estas foram centrifugadas a 16.000 x g a 4°C durante 30 minutos. Após centrifugação, o etanol foi dispensado e as amostras ressuspensas em etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada numa velocidade de 16.000 x g a 4°C durante 15 minutos. O etanol 70% foi desprezado e os tubos permaneceram invertidos até a completa evaporação do etanol. O sedimento de DNA resultante, preso ao fundo do tubo, foi ressuspensado em 50µL de água destilada estéril (Ultra-pure, GIBCO-BRL) e a seguir foi estocado a -20°C.

**PCR genérico com primers consensuais MY09/MY11 e PGMY09/11** - *Primers* genéricos MY 09/ MY 11 e PGMY 09/ PGMY11 foram utilizados na triagem das amostras, para amplificar a seqüência de DNA de 450bp, dentro da região ORF L1 do HPV. O *primer* genérico MY é um *primer* degenerado, no qual durante o processo de síntese são incorporadas em alguns sítios específicos diferentes bases nitrogenadas, a fim de contemplar a seqüência gênica de todos os HPV que infectam o trato genital.

Já o *primer* PGMY consiste na mistura de 12 *primers* codificados separadamente além do *primer* HMBO<sup>9</sup> adicionado a fim de aumentar a sensibilidade da técnica. Na ressuspensão deste *pool* de *primers*, cada oligonucleotídeo participa em igual concentração na mistura gerando um produto de 450 pares de bases.

Como controle interno de reação (controle de qualidade da amostra) usamos um par de *primers* do gene da actina humana, Ac1 e Ac2, que amplificam uma seqüência de 310 bp do DNA humano. Como controle positivo da reação, utilizamos amostras conhecidamente positivas e, como controle negativo, foi utilizada água. Como controle-padrão de peso molecular foi usado Fago λ 123bp (GIBCO, BRL).

A amplificação foi executada em 50µL de uma mistura de reação, composta segundo a **Tabela 1** e realizada em um aparelho termociclador (Pekin Elmer, CETUS). As amostras, após a adição da mistura de reação, foram submetidas a 40 ciclos de amplificação, que seguem o seguinte esquema: 94°C por 1 minuto (desnaturação) => 55°C por 1 minuto (anelamento) => 72°C por 1 minutos (extensão). Antes de iniciar a seqüência de 40 ciclos, as amostras foram colocadas a 94°C por 5 minutos (pré-desnaturação) e, ao final dos ciclos, ficaram a 72°C por 7 minutos (estabilização).

Os produtos obtidos pela PCR foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador e as bandas observadas no gel foram analisadas através de comparação com o padrão de peso molecular escolhido.

## Análise estatística

Para avaliação da significância dos resultados, utilizamos o programa Epi-Info, contendo os testes de Cohen, t-Student e índice Kappa.

## RESULTADOS

**Amostras** - Nosso estudo avaliou 116 espécimes de esfregaços de colo uterino provenientes do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Viroológico do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFF. Estas amostras são provenientes de pacientes atendidas no Hospital Francisco da Cruz Nunes em Itaboraí durante os anos de 2004 e 2005 e no Hospital Moncorvo Filho da UFRJ em 2006 e 2007.

**Resultados da citopatologia** - As amostras selecionadas foram submetidas à técnica de coloração por Papanicolaou e divididas em quatro grupos de acordo com o resultado da leitura deste teste. Dentre as 116 amostras, 28 foram classificadas como normal ou inflamatório, 11 amostras foram agrupadas como ASCUS, 35 apresentaram LSIL ou HPV e 42 amostras tiveram alterações celulares compatíveis com HSIL ou CA.

Cerca de 30 amostras de cada tipo citológico foram selecionadas, exceto, as amostras classificadas como ASCUS, que totalizaram 11 amostras, por não terem sido frequentes nos exames realizados nos hospitais selecionados.

**Resultados obtidos pela PCR** - As 116 amostras selecionadas foram submetidas à reação de PCR utilizando os *primers* genéricos MY09/MY11 para detecção do DNA do HPV. Do total de amostras, 65 apresentaram resultado positivo (56%) e 51 (44%) apresentaram resultado negativo utilizando a técnica de PCR MY.

Pelo PCR PGMY, das 116 amostras, 69 apresentaram resultado positivo (59,5%) e 47 (40,5%) obtiveram resultado negativo.

Para interpretar os resultados obtidos, avaliamos a PCR para cada grupo de acordo com a classificação da citopatologia: das 28 amostras classificadas como normais ou inflamatórias pela citopatologia, 11 (39,3%) apresentaram resultado positivo e 17 (60,7%) foram negativas na PCR MY. Utilizando os novos *primers* PGMY09/PGMY11 na técnica da PCR, das 28 amostras, seis (21,4%) apresentaram resultado positivo e 22 (78,6%) tiveram resultado negativo. Do total de amostras, 21 tiveram resultados iguais, apresentando uma concordância de 75% (21/28), e sete amostras apresentaram resultados discordantes: seis amostras foram positivas para a PCR MY e negativas para a PCR PGMY e uma amostra foi negativa para a PCR MY e positiva para a PCR PGMY.

Das 11 amostras classificadas como ASCUS no exame de Papanicolaou, cinco (45,5%) tiveram resultado positivo tanto para a PCR MY quanto para a PCR PGMY e seis (54,5%) foram negativas após PCR utilizando os *primers* MY09/MY11 e PGMY09/PGMY1, apresentando 100% de concordância entre os resultados.

Das 35 amostras classificadas como LSIL/HPV, 21 foram positivas (60%) e 14 foram negativas para a PCR MY (40%). Após a realização da PCR usando os *primers* PGMY09/PGMY11, 25 (71,4%) amostras tiveram resultado positivo e dez (28,6%) tiveram resultado negativo. Assim sendo, 31 apresentaram resultados concordantes e quatro foram discordantes, sendo positivas para a PCR PGMY e negativas para a PCR MY, demonstrando uma concordância de 88,6% (31/35).

Dentre as 42 amostras HSIL ou CA, 28 (66,7%) foram positivas e 14 (33,3%) foram negativas para a PCR realizada com os *primers* MY. Entretanto, utilizando o par de *primers* PGMY,

33 (78,6%) obtiveram resultado positivo e 9 (21,4%) obtiveram resultado negativo. Comparando os resultados demonstrados pelos dois protocolos de PCR, verificamos que 37 amostras tiveram resultados concordantes e cinco apresentaram resultado positivo para a PCR PGMY e negativo para a PCR MY, resultando numa concordância de 88,1% (37/42).

Do total de 116 amostras, 65 foram positivas e 51 foram negativas para a técnica de PCR MY. Enquanto a realização da PCR PGMY demonstrou a existência de 69 amostras positivas e 47 amostras negativas. É interessante observar que 100 amostras apresentaram resultados concordantes para ambos os *primers* enquanto 16 amostras tiveram resultados contraditórios, sendo que desse total, seis amostras foram positivas para a PCR MY e negativas para a PCR PGMY e dez amostras foram negativas para a PCR MY e positivas para a PCR PGMY. A concordância destes protocolos foi de 86,2% (100/116).

Através da realização do teste de Cohen, obtivemos o índice Kappa, que analisa a concordância entre a PCR MY e a PCR PGMY. O valor encontrado foi de 86,2% (100/116), o que representa uma concordância muito boa de acordo com os valores-padrão.

**Análise estatística entre os resultados da citopatologia e das PCR** - As amostras classificadas como normais, inflamatórias e ASCUS no exame de Papanicolaou não são consideradas relacionadas a infecção pelo HPV (citologia negativa) e as amostras classificadas como LSIL, HSIL e CA, refletem anormalidade citológica associada a infecção pelo HPV (citologia positiva). Dentre as 116 amostras, 77 (66,4%) apresentaram citologia alterada (positiva) e 39 (33,6%) tinham citologia negativa (normal).

**Análise entre PCR MY X Citologia** - Dentre as 77 amostras com citologia positiva, 49 (63,6%) tiveram resultado positivo e 28 (36,4%) apresentaram resultado negativo para a PCR MY. E, entre as 39 amostras negativas na citopatologia, 16 são positivas (41%) e 23 (59%) são negativas para a PCR MY.

A sensibilidade encontrada para o teste de PCR MY foi igual a 63,7% (49/77) e o valor preditivo positivo (VPP) obtido foi de 75,4% (49/65). Em relação à especificidade, o método de PCR apresentou um percentual igual a 59% (23/39), e o valor preditivo negativo (VPN) encontrado foi de 45,1% (23/51).

Através da realização do teste de Cohen, obtivemos o índice Kappa, que analisa a concordância entre os testes citopatológico e a PCR MY. O valor encontrado foi de 0,62 (72/116) que, de acordo com os valores-padrão, pode ser considerado como sendo um bom resultado.

**Análise PCR PGMY X citologia** - Das 77 amostras alteradas da citologia, 58 (75,3%) foram positivas e 19 (24,7%) foram negativas para o teste de PCR PGMY. Dentre as amostras normais na citologia, 11 (28,2%) tiveram resultado positivo e 28 (71,8%) tiveram resultado negativo para o teste de PCR PGMY.

O teste de PCR PGMY apresentou uma sensibilidade de 76,6% (58/77) e o valor preditivo positivo (VPP) foi 89,2% (58/65). E a especificidade dessa técnica foi de 71,8% (28/39) e o valor preditivo negativo encontrado foi de 54,9% (28/51).

Utilizando o teste de Cohen, foi obtido o índice Kappa que reflete a concordância entre a PCR PGMY e o teste citopatológico.

co. O valor de Kappa encontrado foi de 0,74 (86/116), demonstrando uma boa concordância.

## DISCUSSÃO

A infecção por HPV genital é a doença sexualmente transmitida mais diagnosticada em populações de jovens sexualmente ativos. Muitas mulheres são infectadas pelo HPV, mas grande parte das infecções é transitória. A persistência da infecção associada com outros fatores de risco pode resultar em câncer de colo de útero. A detecção e tratamento precoces de lesões pré-malignas causadas por HPV podem prevenir a progressão ao câncer<sup>4</sup>.

A reação em cadeia por polimerase (PCR) é capaz de detectar a presença de DNA viral nas amostras de esfregaço cervical. Existem diversos protocolos para a PCR, mas os mais utilizados são aqueles onde ocorre amplificação de regiões conservadas do genoma viral, como o gene L1 ou o gene E1, para a detecção de vários tipos de HPV genitais relevantes em uma única reação, através do uso de diferentes tipos de *primers* degenerados<sup>4</sup>.

Dois pares de primers são os mais utilizados, o par de *primers* MY09/MY11 capaz de identificar mais de 25 genótipos de HPV<sup>9</sup> e par de oligonucleotídeos PGMY09/PGMY11, que se trata de uma mistura de 18 *primers* diferentes (cinco *primers* PGMY11 + um *primer* HMBO e 12 *primers* PGMY09), com a finalidade de eliminar as degenerações e melhorar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de outros *primers* que amplificam regiões conservadas do gene viral L1, através da produção de amplicons de 450 pb<sup>10</sup>.

Alguns estudos afirmam que o *primer* PGMY apresenta maior sensibilidade na amplificação do DNA do HPV em amostras genitais do que o par de *primers* MY. Isto porque, nesta nova formulação todos os diferentes *primers* são adicionados à mistura de reação na mesma concentração, eliminando risco de falsos-negativos, que ocorriam no PCR MY, por competição de *primers*, principalmente em casos de infecções múltiplas<sup>9-11</sup>.

Nosso estudo analisou a eficiência dos *primers* MY e PGMY em detectar o DNA do HPV em amostras de esfregaço cervical e comparou esses resultados com a citopatologia dessas amostras a fim de verificar se realmente o par de *primers* PGMY apresentava maior sensibilidade em relação ao par MY e qual a importância clínica desse achado.

As amostras selecionadas foram agrupadas de acordo com o resultado do teste de Papanicolaou. Nas amostras classificadas como normal/inflamatório, observamos uma concordância de 75% nos resultados dos dois pares de *primers*. Observamos seis negativas para a PCR PGMY foram positivas para a PCR MY (Tabela 2). Esses resultados refletem uma discrepância com aqueles encontrados na literatura, que afirmam ser a PCR PGMY mais sensível na detecção do DNA viral do que a PCR MY<sup>10</sup>. Esse achado pode significar que apesar de ser muito sensível, o par de *primers* PGMY não apresenta 100% de sensibilidade, portanto poderiam ocorrer algumas perdas na detecção da infecção. Por outro lado, podem ter ocorrido falsos-positivos durante a PCR MY. Finalmente, como a citologia classifica essas amostras como normais (sem lesão), mesmo que a reação realizada como par de *primers* MY esteja correta e aponte infecção pelo HPV, esta não apresenta relevância clínica, pois não vai modificar a conduta do

médico. Por serem dados conflitantes, todas as reações das amostras normais/inflamatórias foram repetidas e confirmadas.

As amostras classificadas como ASCUS apresentaram 100% de concordância entre os dois *primers*, não apontando nenhuma vantagem no emprego do novo par de *primers* PGMY. É interessante observar que do total de 11 amostras, cinco foram positivas e seis foram negativas para os dois pares de *primers* (Tabela 2), resultado que está de acordo com literatura que afirma que aproximadamente 30 a 50% dos casos de ASCUS estão relacionados com o HPV<sup>4</sup>. Segundo Burd (2003), uma das vantagens da associação da detecção molecular dos HPV com a citologia é auxiliar o diagnóstico de mulheres que apresentaram estes resultados indeterminados na triagem cervical comum.

Uma concordância de 88,6% foi encontrada entre os resultados das duas PCR nas amostras agrupadas como LSIL/HPV pelo teste de Papanicolaou. De 35 espécimes, quatro apresentaram resultados discordantes, sendo negativas para o MY e positivas para o PGMY (Tabela 2), refletindo uma maior sensibilidade deste na detecção do DNA viral nesse grupo, fato que condiz com os relatados na literatura, durante comparação dos dois *primers*, permitindo a detecção precoce mais eficiente de lesões que podem progredir para câncer cervical, podendo assim contribuir para a prevenção da transformação maligna por auxiliar o clínico na escolha de acompanhamento e tratamento mais adequados.

No grupo classificado como HSIL/CA onde se observa uma concordância de 88,1%, de 42 amostras, cinco foram negativas para a PCR MY e positivas para a PCR PGMY (Tabela 2), demonstrando uma maior sensibilidade do par de *primers* PGMY que apresenta-se coerente com a citologia desse grupo que se trata de uma citologia alterada. Esse resultado não tem repercussão clínica, pois nota-se a presença de lesão de alto risco ou câncer independente de ser HPV positivo ou negativo, mas corrobora a ideia de maior sensibilidade com maior concordância com a citologia.

Analisando somente os resultados das duas PCR, sem considerarmos a citopatologia, observamos uma concordância de 86,2% (Tabela 2) após ser realizado o teste de Cohen (índice Kappa) que reflete uma concordância muito boa entre os resultados obtidos pela execução da PCR com os dois *primers*.

Através da análise dos resultados observamos que, das 116 amostras avaliadas em nosso estudo através do exame de Papanicolaou, 77 apresentaram citologia alterada (66,4%), englobando as alterações citológicas do tipo HPV, LSIL, HSIL e CA; e 39 apresentaram citologia normal (33,6%), sendo classificadas como normais, inflamatórias ou ASCUS.

Comparando estes resultados com a PCR, observamos algumas discrepâncias. Os resultados negativos obtidos pelo método molecular, em contraposição à citologia positiva podem ter sido ocasionados por utilização de amostragem com baixa celularidade, uma vez que o material reservado para o teste molecular trata-se da segunda coleta da paciente em um mesmo momento; ocorrência de falsos-negativos por não ser um método com 100% de eficácia, havendo perdas durante a extração do DNA; integração do genoma do vírus no genoma da célula hospedeira o que impede a amplificação do material viral, devido ao fato de nesses casos ocorrerem a inativação do gene E2 e, assim, o gene L1 não pode ser codificado e como tanto o *primer* MY quanto o

**Tabela 1.** Composição da mistura de reação da PCR genérica.

Quantidade		Componente
5 µL		Tampão de PCR 10X
3 µL	50 mM	Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> )
1 µL	200 µmol	Nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1 µL	50 pmoles	Oligonucleotídeos MY 09 ou PGMY 09
1 µL	50 pmoles	Oligonucleotídeos MY 11 ou PGMY 11
0,1 µL	5 pmoles	Oligonucleotídeos Ac 1
0,1 µL	5 pmoles	Oligonucleotídeos Ac 2
0,25 µL	0,25 unidades	Taq polimerase
	µL	Amostra
	qsq. 50µL	Água

**Tabela 2.** Resultados de PCR

	PGMY		MY		Concordância
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	
<b>Normal/Inflamatório</b>	22	6	17	11	75%
<b>ASCUS</b>	6	5	6	5	100%
<b>LSIL/HPV</b>	10	25	14	21	88,6%
<b>HSIL/CA</b>	9	33	14	28	88,1%
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>69</b>	<b>51</b>	<b>65</b>	

**Tabela 3.** Sensibilidade e especificidade PCR MY vs. citologia.

		Citologia		
		Positiva (Alterada)	Negativa (Normal)	Total
PCR MY	<b>Positivo</b>	49	16	65
	<b>Negativo</b>	28	23	51
	<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>39</b>	<b>116</b>

**Tabela 4.** Sensibilidade e especificidade PCR PGMY vs. citologia.

		Citologia		
		Positiva (Alterada)	Negativa (Normal)	Total
PCR PGMY	<b>Positivo</b>	58	11	65
	<b>Negativo</b>	19	28	51
	<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>39</b>	<b>116</b>

PGMY amplificam sequências do DNA viral da região L1, não é possível detectar o vírus nesses casos. Podem ainda ter ocorrido, resultados falso-positivos no exame citológico devido à presença de artefatos contaminantes como muco, bactérias, sangue ou por inexperiência do patologista.

Em relação às amostras com citologia normal, 16 foram positivas para a PCR e 23 foram negativas demonstrando que apesar de não apresentar alterações citológicas, existe a presença do DNA viral nas amostras. Tal fato pode ser devido a uma infecção latente ou transitória assintomática, irrelevantes clinicamente, ou ainda que se tratavam de falso-negativos da citologia onde, por exemplo, o escovado cervical pode não ter sido realizado corretamente, impedindo a visualização de alterações citológicas durante a coloração de Papanicolaou.

Nossos resultados mostram uma sensibilidade de 63,7% e VPP de 75,4% para a PCR MY (**Tabela 3**). Para o PGMY, obtivemos resultados melhores: uma sensibilidade de 76,6% e VPP

igual a 89,2% (**Tabela 4**). Assim, nossos resultados confirmam os dados descritos na literatura que afirmam serem os *primers* PGMY09/11 mais sensíveis do que os *primers* MY09/11 e, portanto são melhores para detectar a presença de infecção pelo HPV, em casos clinicamente relevantes<sup>9-11</sup>.

Além disso, observamos uma especificidade e VPN de 59% e 45,1% respectivamente, para a PCR MY (**Tabela 3**) e especificidade de 71,8% e VPN de 54,9% para a PCR PGMY (**Tabela 4**) demonstrando que esse último par de *primers* é realmente mais específico, apontando casos clinicamente relevantes e auxiliando na classificação de pacientes de risco para que sejam solicitados exames de tipagem, a fim de detectar possíveis vírus oncogênicos. É importante ressaltar que a presença destes vírus poderá determinar um *follow-up* mais adequado, com visitas mais frequentes das pacientes de risco ao ginecologista.

Através da realização do teste de Cohen, foi obtido o índice de Kappa que visa determinar os índices de concordância entre o

teste molecular (PCR) e a citopatologia e observamos que os dois tipos de *primers* apresentam uma concordância boa, com valores de Kappa de 0,62 para a PCR MY e um pouco maior (0,74) para a PCR PGMY. Portanto, podemos concluir que o método molecular e o Papanicolaou se completam na detecção viral, sendo que o par de *primers* PGMY apresenta uma melhor sensibilidade, especificidade do que o par de *primers* MY.

Como já descrito por Villa (2002), a padronização e utilização dos testes de PCR cada vez mais eficazes ajudariam na identificação de tipos de HPV e na busca do tratamento mais adequado a ser adotado pelo médico a fim de prevenir efetivamente o câncer cervical, principalmente nas pacientes infectadas por HPV de maior potencial oncogênico.

Através desse trabalho concluímos que o par de *primers* PGMY apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV quando comparado com o par de *primers* MY, apesar de não ser um método 100% eficaz, podendo admitir algumas perdas, principalmente na detecção de infecções assintomáticas.

## CONCLUSÃO

Assim, concluímos que o novo par de *primers* PGMY09/11 deve substituir o antigo MY09/11 para melhorar a detecção genômica de HPV e contribuir de maneira mais eficiente para prevenção do câncer cervical.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006; 208(2): 152-64
2. Marc S, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 2007; 107: S2-S5.
3. Munoz N, Castellsague X, De Gonzalez AB et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006; 24S3: S1-S10.
4. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(1): 1-17.
5. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-527.
6. Ho GYF, Bierman R, Bearsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. *New Eng J Med* 1998; 338: 423-428.
7. Schiffman MH. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 18: 84(6): 394-8.
8. Zanotti KM & Belinson J. Update on the diagnosis and treatment of Human papillomavirus infection. *Cleveland Clinical Journal of Medicine* 2002; 69 (12): 948-961.
9. Giovannelli L, Lama A, Capra G, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(8): 3861-3864.
10. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(1): 357-361.
11. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H. The Canadian Women's HIV Study Group, Franco, E. Use of PGMY Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (3): 902-907.
12. Villa LL, Bernard HU, Kast M, Hildesheim A, Amestoy G, Franco EL. Past, present, and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference-HPV2001. *Virus Res* 2002; 89(2): 163-73.

### Endereço para correspondência:

**SILVIA MARIA BAETA CAVALCANTI**

Laboratório de Diagnóstico Viroológico, MIP/UFF.

Rua Professor Hernani Melo 101 sala 321. Centro, Niterói, RJ.

CEP: 24210- 130

E-mail: silviacavalcanti@vm.uff.br

Recebido em: 02/07/2008

Aprovado em: 17/10/2008