

## Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano (HPV) numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa

*First studies on the identification of human papillomavirus (HPV) genotypes in a vaccinated Portuguese female population with active sexual activity*

Raquel Rocha<sup>1</sup>, Grupo de Estudo da Vacina do HPV<sup>2</sup>, Nuno Verdasca<sup>1</sup>

maria.rocha@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório do Vírus do Papiloma Humano. Unidade de Infecções Sexualmente Transmissíveis. Departamento Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Maternidade Alfredo da Costa, Lisboa; Maternidade Bissaya Barreto, Coimbra; Maternidade Daniel de Matos, Coimbra; UCSP-Polo A, Ramada; USF Cruzeiro, Odivelas; USF Ramada, Ramada; USF Magnólia, Stº António Cavaleiros; USF Tejo, Sacavém; USF Valflores, Póvoa de Stª Iria; USF Carnide Quer, Lisboa; USF Alma Mater, Reboleira; USF Mactamá, Queluz; USF Sobreda, Almada; UCSP Tortosendo, Tortosendo; UCSP Covilhã, Covilhã; UCSP Teixoso, Teixoso; USCP Belmonte, Belmonte; Centro Hospitalar Póvoa do Varzim e Vila do Conde, Póvoa do Varzim; Hospital Vila Franca de Xira, Vila Franca de Xira.

### \_Resumo

A infeção por HPV é responsável por 99,7% dos casos de cancro de colo do útero a nível mundial. De modo a prevenir e a minimizar o impacto da infeção por HPV na saúde das mulheres foram desenvolvidas vacinas. A vacina tetravalente está incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV) desde 2008. Com o objetivo de se conhecer a distribuição dos genótipos HPV estudaram-se 152 amostras clínicas de mulheres jovens vacinadas com atividade sexual ativa. As amostras clínicas foram colhidas por *cytobrush*, procedeu-se à deteção e tipificação do HPV pela técnica de *microarrays*. Das mulheres estudadas, 28,3% apresentaram infeção por genótipos HPV, dos quais 58,1% corresponderam a genótipos de alto risco, sendo mais frequente o HPV 51 (15,2%) seguido do HPV 59 e HPV 58 com 7,6% e 6,1%, respetivamente. Foram também detetados dois casos de infeção por HPV 16, que é um dos genótipos incluído na vacina. Genótipos de baixo risco foram detetados em 25,6% de infeções, sendo o HPV42 o mais frequente com 9,1% dos casos. A história vacinal demonstrou que 83,1% das mulheres foram vacinadas ao abrigo do PNV e iniciaram atividade sexual após administração da vacina, e que 53,6% das mulheres vacinadas fora do PNV iniciaram atividade sexual antes da administração da vacina. Portugal apresenta uma taxa de cobertura vacinal elevada. Estes primeiros resultados reforçam a importância da administração da vacina antes do início da atividade sexual e de se manter o rastreio do cancro do colo do útero.

### \_Abstract

Infection with HPV is responsible for 99.7% cases of cervical cancer worldwide, to prevent and minimize the impact on women's health have been developed vaccines against HPV infection. The tetravalent vaccine is included in the National Immunization Program (PNV) since 2008. With the aim to know the distribution of HPV genotypes, 152 clinical samples of young women who have started sexual life were studied. Clinical samples were collected by *cytobrush*, HPV detection and typing was performed by the *microarray* methodology. Of the women studied, 28.3% presented infection for HPV genotypes, 58.1% corresponding to the high-risk genotypes, with HPV 51 (15.2%) being more frequent followed by HPV 59 and HPV 58 with 7.6% and 6.1%, respectively. Two cases of HPV 16 infection were also detected, genotype included in the vaccine. Low-risk genotypes were detected

in 25.6% of the infections with HPV 42 being the most frequent in 9.1% of the cases. Vaccine history showed 83.1% of women were vaccinated in the current immunization program and started sexual activity after HPV vaccine administration, and 53.6% of women vaccinated outside current immunization program started sexual activity before to vaccine administration. Portugal has a high vaccination coverage rate. However, these early results reinforce the importance of administration the vaccine before the onset of sexual activity and to keep tracking of cervical cancer.

### \_Introdução

A infeção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) é uma das infeções mais comuns transmitidas sexualmente, constituindo um problema de saúde pública com elevada morbidade e mortalidade na população feminina. Anualmente estima-se que existam cerca de 528.000 novos casos de cancro por HPV, sendo este o quarto cancro mais comum na população feminina a nível mundial (1). Segundo o estudo "A Cleopatre Portugal Study" estima-se uma prevalência da infeção por HPV na população portuguesa feminina entre os 18 e os 64 anos de idade de 12,7%, sendo a mais elevada para o grupo etário entre os 20 e 24 anos (28,8%) (2).

Encontram-se identificados mais de 200 genótipos de HPV, em que 40 infetam preferencialmente o trato anogenital. A Agência Internacional de Investigação Cancro (IARC) com base na epidemiologia molecular, suportada pela evidência epidemiológica, classificou consoante o potencial oncogénico os vários genótipos de HPV em genótipos de baixo risco e de alto risco, bem como em genótipos de possível alto risco, de provável alto risco e de risco indeterminado (3,5).

Os genótipos de HPV de alto risco são responsáveis por cerca de 99,7% dos casos de cancro do colo do útero, sendo os mais comuns os genótipos HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Por outro lado, os genótipos HPV 16 e HPV 18 são os que possuem um potencial oncogénico mais elevado, representando cerca de 70% a 75% dos casos de cancro a nível mundial (6,7). Os genótipos de HPV de baixo risco estão associados a lesões benignas, como verrugas anogenitais ou condilomas acuminados, sendo em 90% dos casos identificados os genótipos HPV 6 e HPV 11 (7,8).

Sendo uma infeção muito frequente nas faixas etárias mais jovens, e dada a sua associação com o aparecimento de cancro do colo do útero, foram desenvolvidas vacinas de modo a prevenir e a minimizar o impacto da infeção por HPV na saúde das mulheres. A vacina bivalente (genótipos HPV 16 e 18) previne o cancro do colo do útero e a tetravalente (genótipos 6, 11, 16 e 18) é prescrita igualmente para a prevenção do cancro do colo do útero, mas também para as lesões pré-malignas do colo do útero, da vulva, da vagina e das verrugas genitais (condilomas). A partir de março de 2015 ficou disponível na Europa a vacina nonavalente, que inclui os genótipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, o que veio aumentar o grau de proteção contra a infeção por HPV e o subsequente aparecimento de casos de cancro de colo do útero (6,9,10).

Portugal, comparativamente com outros países europeus, apresenta uma taxa de cobertura vacinal elevada, estando desde 2008 a vacina tetravalente incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV), inicialmente administrada às mulheres com 13 anos de idade (nascidas a partir de 1995), em três doses, segundo o esquema de 0, 2 e 6 meses. Entre 2009 e 2011 foram abrangidas pelo PNV as mulheres que completavam 17 anos durante esse período (nascidas entre 1992 e 1994). Em 2014, a administração da vacina foi antecipada para os 10 anos de idade, em duas doses, segundo o esquema de 0 e 6 meses, de forma a manter uma elevada cobertura (11,13). No início de 2017, a Direção-Geral da Saúde (DGS) determinou a introdução no PNV da vacina nonavalente (em vez da tetravalente), mantendo o mesmo esquema vacinal (14).

Como tem vindo a ser referido na literatura torna-se importante verificar quais os efeitos da introdução no PNV da vacina do HPV na população vacinada, por forma a conhecer a distribuição dos genótipos de HPV que não estejam incluídos na vacina e, assim, possam conferir infeção (15).

### **\_Objetivo**

O presente estudo, a decorrer desde setembro de 2014, pretende dar a conhecer os primeiros resultados da identificação dos genótipos de HPV em Portugal numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa.

### **\_Material e métodos**

Participaram no estudo 19 instituições que desde setembro de 2014 integram o Grupo de Estudo da Vacina do HPV, bem como o Laboratório do Vírus do Papiloma Humano da Unidade de Infeções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

Realizou-se um estudo observacional transversal, entre setembro de 2014 e dezembro de 2016, em que se analisaram durante o período sob observação amostras clínicas de mulheres jovens vacinadas, que à data já tinham iniciado atividade sexual, e que voluntariamente se deslocaram às consultas das unidades participantes das respetivas regiões de saúde.

As amostras clínicas foram colhidas por *cytobrush*, a extração de DNA foi realizada utilizando o sistema automático NucliSENS® easyMAG® (Biomérieux). A deteção e tipificação do HPV foi efetuada pela técnica de *microarrays*, com o sistema comercial CLART® HPV2 (Genomica, Espanha). Esta técnica amplifica um fragmento de 450pb da região L1, que permite a identificação de 35 genótipos do HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43,44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 e 89), segundo as indicações do fabricante (16).

Efetuuou-se também a análise molecular convencional que incluiu a amplificação por PCR da região L1, seguida de purificação e sequenciação, de modo a determinar a presença

artigos breves\_ n. 1

de outros genótipos de HPV não detetados pelo sistema comercial CLART®HPV2. A classificação dos tipos de genótipos HPV obtidos baseou-se na nomenclatura determinada pelo IARC (3).

**Resultados e discussão**

Entre setembro de 2014 e dezembro de 2016 foram estudadas 152 mulheres jovens vacinadas com atividade sexual ativa, com idades compreendidas entre os 14 e os 30 anos, sendo a média de idades de 21 anos. Das 152 mulheres estudadas, 28,3% (43/152) apresentaram uma infeção por HPV (gráfico 1).

Das 43 mulheres positivas para a infeção por HPV, 58,1% (25/43) estavam infetadas com genótipos de alto risco, sendo que duas das mulheres apresentaram infeção pelo genótipo HPV 16. Em 41,8% (18/43) das mulheres foram identificados genótipos de possível alto risco e em 25,6% (11/43) verificou-se a presença de genótipos de baixo risco (tabela 1).

Foram identificados 21 genótipos de HPV quer em infeções simples quer mistas o que perfaz um total de 66 HPV identificados.

O HPV mais frequente foi o genótipo de alto risco, HPV 51, observado em 15,2% (10/66) dos tipos de HPV identificados. Para além deste, os outros genótipos mais frequentes foram o HPV 53 e o HPV 66, ambos classificados como genótipos de possível alto risco e ambos detetados em 12,1% (8/66) dos casos. Dos genótipos de baixo risco o mais frequente foi o HPV 42, representando 9,1% (6/66) dos casos de infeção por HPV (gráfico 2).

Nas amostras positivas para os genótipos de alto risco, os tipos de HPV 45, 52 e 58 foram detetados em 10,6% (7/66) dos casos. Estes genótipos encontram-se incluídos na vacina nonavalente (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58) que desde janeiro de 2017, substituiu a vacina tetravalente no PNV, aumentando assim a proteção conferida pela vacina até agora utilizada e potencialmente irá prevenir um maior número de casos de cancro do colo do útero.

Em 32,6% (14/43) das mulheres infetadas foi identificado mais do que um genótipo (infeções mistas), a maioria destas coinfeções estava associada com genótipos HPV de alto risco (12/14).

Gráfico 1: Distribuição dos casos infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016.

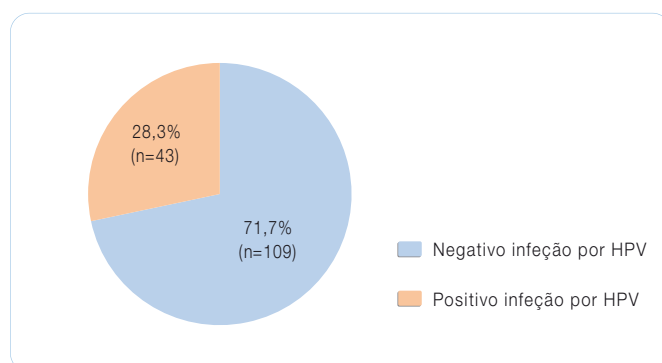
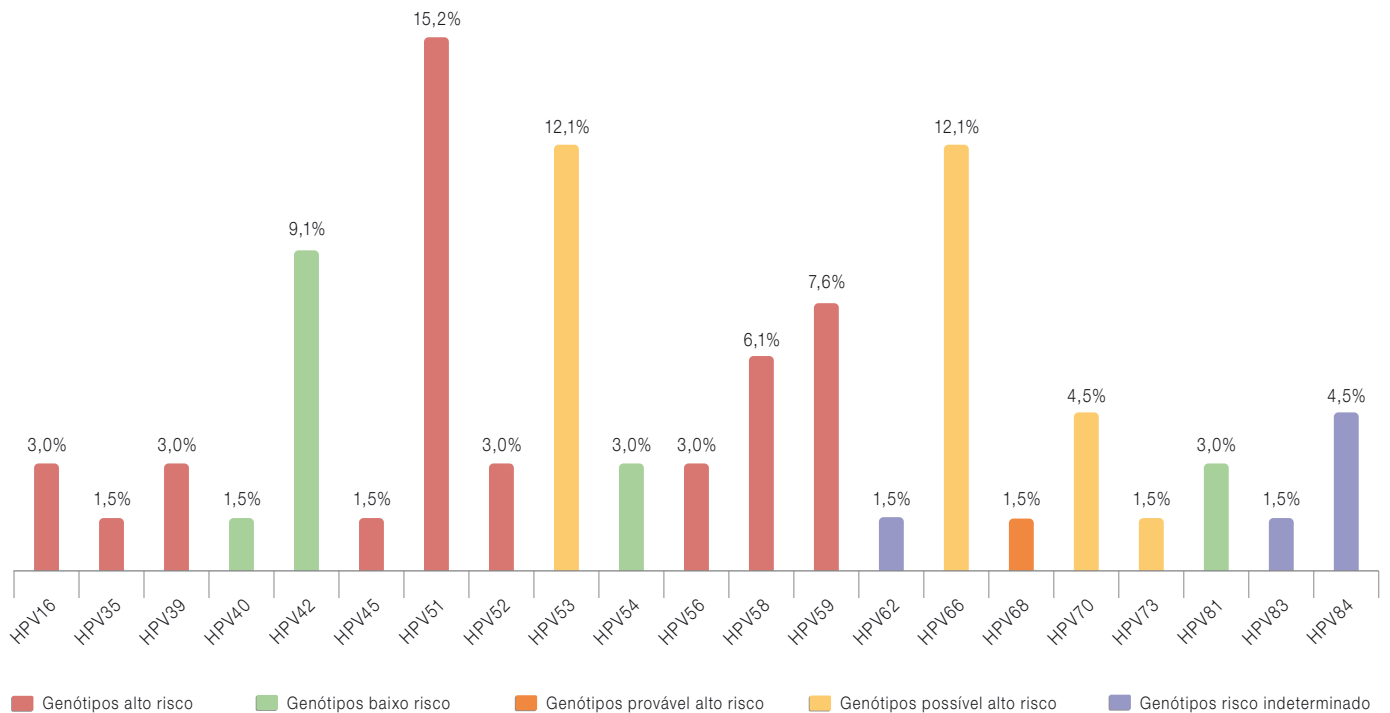


Tabela 1: Genótipos de HPV detetados segundo o potencial oncogénico nas 43 mulheres com infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016.

	nº mulheres estudadas	nº mulheres infetadas por HPV	Genótipos alto risco		Genótipos baixo risco		Genótipos possível alto risco		Genótipos risco indeterminado	
			nº mulheres infetadas*	%	nº mulheres infetadas*	%	nº mulheres infetadas*	%	nº mulheres infetadas*	%
Total	152	43	25	58,1	11	25,6	18	41,8	5	11,6

\* as mulheres podem estar infetadas com mais de que um genótipo de HPV.

Gráfico 2: Distribuição dos génotipos de HPV detetados nas 43 mulheres\* com infeção por HPV, setembro de 2014-dezembro de 2016.

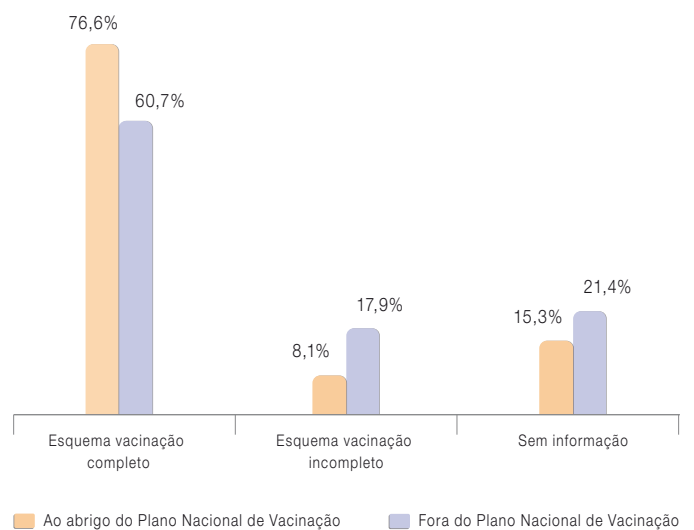


\* as mulheres podem estar infetadas com mais do que um génotipo de HPV.

Foi possível conhecer a história vacinal das 152 mulheres estudadas, em que 81,6% (124/152) foram vacinadas ao abrigo do PNV e 18,4% (28/152) foram vacinadas fora do PNV. Das mulheres vacinadas ao abrigo do PNV, 76,6% (95/124) cumpriram o esquema de vacinação preconizado, aquando da introdução da vacina no PNV. Destas mulheres, 76 nasceram depois de 1995, tendo iniciado a vacinação aos 13 anos, de acordo com o PNV. Acresce que, também no âmbito do PNV, as 48 mulheres que nasceram entre 1992 e 1994, foram vacinadas durante a campanha de vacinação que decorreu entre 2009 e 2011, dirigida às mulheres que completavam 17 anos nestes dois anos civis.


Das 28 mulheres que foram vacinadas fora do PNV, 60,7% (17/28) respeitaram o esquema de vacinação recomendado pelo PNV (gráfico 3), verificando-se que a vacina administrada neste grupo de mulheres foi a tetravalente, à exceção de duas para as quais não se possui informação.

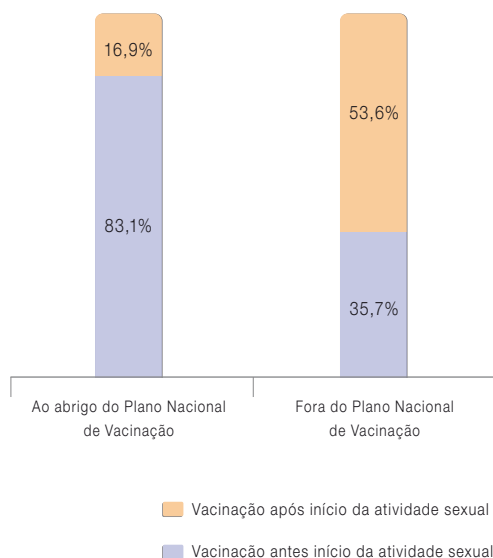
Gráfico 3: Esquema de vacinação de acordo com o número de doses recomendadas pelo PNV na população estudada, setembro de 2014-dezembro de 2016.



Os fatores de risco para a aquisição da infeção por HPV são comuns às outras infeções sexualmente transmissíveis. As 152 mulheres estudadas, entre setembro 2014 e dezembro de 2016, tinham uma média de idades de início da atividade sexual de 16,8 anos, 88,8% (135/152) das quais tiveram um parceiro sexual nos últimos três meses e 44,1% (67/152) declararam usar preservativo.

Das mulheres vacinadas ao abrigo do PNV, 83,1% (103/124) iniciaram a atividade sexual após a administração da vacina, enquanto 53,6% (15/28) das mulheres vacinadas fora do PNV iniciaram a atividade sexual antes da administração da vacina (gráfico 4).

Gráfico 4:  Proporção de mulheres vacinadas ao abrigo do PNV e fora do PNV antes e após o início da atividade sexual, setembro de 2014-dezembro de 2016.



## \_Conclusão

Neste estudo a maioria das mulheres vacinadas com atividade sexual ativa não estavam infetadas por HPV.

Do total de mulheres infetadas observou-se a deteção de uma elevada frequência de genótipos HPV de alto risco associados ao cancro do colo do útero, dos quais apenas dois casos pelo genótipo HPV 16, presente na vacina. Tendo em conta que a vacina só confere total proteção se for administrada antes do

contacto com o vírus, a única forma de garantir a efetividade vacinal é a administração ocorrer antes do início da atividade sexual. Os casos de infeção pelo HPV 16 encontrados neste estudo não podem ser considerados como falência da vacina, uma vez que as duas mulheres vacinadas tinham iniciado atividade sexual antes da administração da vacina do HPV. Esta constatação realça a importância da administração da vacina antes do início da atividade sexual.

Acresce que se observou que a maioria das mulheres vacinadas com infeção por HPV que iniciaram a sua atividade sexual após a vacinação não apresentaram infeção para os genótipos incluídos na vacina. Este facto sugere, só por si, a eficácia da vacina na prevenção da infeção por HPV e reforça a decisão de Portugal incluir a mesma no PNV.

## Agradecimentos

A todos os médicos e enfermeiros das Unidades de Saúde que integram o Grupo de Estudo da Vacina do HPV pela disponibilidade demonstrada para efetuarem a seleção da população-alvo e a colheita das amostras clínicas necessárias para o estudo. Aos Colegas da Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética do INSA. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Cervical cancer – Estimated incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Em linha]. WHO/IARC, 2015. [consult. 27/4/2017]. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>
- (2) Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, et al. ; CLEOPATRE Portugal Study Group. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Study. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(6):1150-8.
- (3) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon: Agency for Research on Cancer, 2007. (IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans; 90). <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>
- (4) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types associated with Cervical Cancer. N Engl J Med. 2003; 348(6):518-27. [www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021641](http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa021641)
- (5) Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006;24(Suppl 3):S3/1-10.
- (6) European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance for the Introduction of HPV Vaccines in EU Countries. Stockholm: ECDC, 2008.
- (7) Monk BJ, Tewari KS. The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection. Gynecol Oncol. 2007;107(2 Suppl 1):S6-13.

artigos breves\_ n. 1

- (8) Kjaer SK, Tran TN, Sørensen P, et al. The burden of genital warts: a Study of nearly 70.000 women from the general female population in the 4 Nordic countries. *J Infect Dis.* 2007;196(10):1447-54.
- (9) European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. EMA/CHMP/76588/2015, 2015 March 26. Summary of opinion (initial authorisation) on Gardasil 9- human papillomavirus 9-valent vaccine (recombinant, adsorbed). [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/003852/WC500184904.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/003852/WC500184904.pdf)
- (10) Riethmuller D, Jacquard AC, St Guily JL et al. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health.* 2015;15:453. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433025/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433025/)
- (11) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº 22/DSCS/DPCD, de 17/10/2008. Programa Nacional de Vacinação (PNV) Introdução da vacina contra infeções por Vírus do Papiloma Humano. [www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i010243.pdf](http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i010243.pdf)
- (12) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 016/2014, de 29/09/2014 (atualizada a 01/10/2014). Programa Nacional de Vacinação - Alteração do esquema da vacina contra infeções por vírus do Papiloma humano (HPV). [www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0162014-de-29092014.aspx](http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0162014-de-29092014.aspx)
- (13) Direção-Geral da Saúde. A vacinação contra o vírus do papiloma humano (HPV) em Portugal. *Boletim Vacinação.* 2014; 8 (edição especial). [www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/boletim-vacinacao-edicao-especial-abril-2014-pdf.aspx](http://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/boletim-vacinacao-edicao-especial-abril-2014-pdf.aspx)
- (14) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 016/2016, de 16/12/2016. Novo Programa Nacional de Vacinação - PNV 2017. [www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0162016-de-16122016.aspx](http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0162016-de-16122016.aspx)
- (15) Deleré Y, Remschmidt C, Leuschner J, et al. Human Papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 years-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling. *BMC Infectious Diseases.* 2014; 14:87. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933406/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933406/)
- (16) CLART® Papillomavirus Humano 2 – Genotipagem de Papilomavirus Humano por identificação genómica para diagnóstico in vitro. Genomica, S.A.U.; Espanha. 2015; vs13.