



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS
PROFISSIONAL

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DA
INFECÇÃO GENITAL PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E
HERPESVÍRUS HUMANO (HHV) TIPO 1 E TIPO 2**

JÉSSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

Belém-Pará
2019

JESSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DA
INFECÇÃO GENITAL PELO PAPILLOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E
HERPESVÍRUS HUMANO (HHV) TIPO 1 E TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Jacqueline Cortinhas Monteiro

Belém-Pará

2019

JESSICA SABRINA CORDEIRO PARENTE

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX PARA A DETECÇÃO DA
INFECÇÃO GENITAL PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E HERPESVÍRUS
HUMANO (HHV) TIPO 1 E TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Análises Clínicas.

Orientador(a):

Profª. Drª. Jacqueline Cortinhas Monteiro
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Lucimar Di Paula dos S. Madeira
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Profª. Drª. Renata Bezerra Hermes de Castro
Fundação HEMOPA

Profª. Drª. Nubia Caroline Costa de Almeida
Fundação HEMOPA

Profª. Drª. Samara Tatielle Monteiro Gomes (Suplente)
Instituto Evandro Chagas

Belém, 10 de abril de 2019

EPÍGRAFE

*“Seja você mesma e aprenda a valorizar
O que te eleva num dia
E te põe pra baixo no outro
Protegendo o lugar de onde seu poder emana
De onde emana sua dor
Não deixe sua cabeça negar qualquer memória
Nem seus olhos
Nem seu coração
Tudo pode ser usado
Menos o dispensável
Nunca lamente sua falta de poder
A menos que esteja condenada a atenuar-la
Se você não aprender a odiar
Você nunca estará sozinha o suficiente
Para amar facilmente
Nem será corajosa o suficiente,
Embora isso não surja facilmente
Cada vez que amar
Ame profundamente
Como se fosse para sempre
Apenas o nada é eterno.
Fale com orgulho com suas crianças
Sempre que encontrá-las
Diga-lhes que você é descendente de escravos
E que sua mãe foi uma princesa na escuridão.”*

Audre Lorde

À minha mãe Cleuma,
por estar e superar
cada dia comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz, força e coragem concedidas durante a jornada.

Ao Laboratório Paulo Azevedo, pelo suporte financeiro disponibilizado através da concessão de bolsa de mestrado durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha orientadora Jacqueline Cortinhas Monteiro, por acreditar em mim como aluna e pessoa, por me confiar um projeto tão especial, pela sua disponibilidade a qualquer hora, pela orientação dedicada e minuciosa. Por ser exatamente quem você é, muito obrigada.

Aos parceiros e amigos do Laboratório de Virologia, em especial à Viviane Araújo, pela companhia e ajuda nas longas horas de experimento, à Lorena Lima, Alysson Quintino, Tuane Ferreira, William Botelho, Angélica Menezes, pelo conhecimento compartilhado, companheirismo e amizade.

A equipe do Laboratório Paulo Azevedo, em especial à Deborah Tobelem, Nilmara Castro, Monyque Ribeiro, Camila Brito, Ana Paula Paixão, e Lacy Brito, fundamentais na realização deste mestrado, obrigada por todo tempo disponibilizado, paciência e ensinamentos. Levo destes dois anos junto à vocês um aprendizado para toda a vida.

A minhas amigas, Camila Costa, Adrielly Uchôa, Thainara Soares e Thainá Soares, por estarem comigo em todos os momentos, me apoiando, ajudando e tornando os meus dias sempre melhores. Obrigada por tudo.

Aos meus avós, Francisco e Beatriz, por me ensinarem a ter fé, e nunca desistir. Por estarem do meu lado em cada momento, pelo amor incondicional, pelo apoio e motivação diária. Por serem o meu maior exemplo, e a força que eu necessito para enfrentar todas as dificuldades.

A minha mãe, Cleuma Cordeiro, e minhas irmãs Raissa e Maria Luiza, por todo o amor, compreensão e cuidado, por recarregarem minhas energias, e por acreditarem que seria possível.

A todos que ajudaram a traçar esta caminhada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HERPESVÍRUS	1
1.1.1. Taxonomia	1
1.1.2. Morfologia e organização genômica	2
1.1.3. Manifestações clínicas dos herpesvírus	3
1.1.4. Epidemiologia	6
1.1.5. Diagnóstico	7
1.1.6. Tratamento	9
1.2. PAPILLOMAVÍRUS HUMANO	9
1.2.1. Taxonomia	9
1.2.2. Morfologia e organização genômica	11
1.2.3. Manifestações clínicas	12
1.2.4. Epidemiologia	13
1.2.5. Diagnóstico	14
1.2.6. Tratamento	15
1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A CO-INFECÇÃO ENTRE HPV, HHV-1 E 2.	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. TIPO DE ESTUDO	19
3.2. SELEÇÃO DOS CONTROLES DE HHV-1, HHV-2 e HPV, E EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO	19
3.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO	20
3.4. ESCOLHA DOS INICIADORES	20
3.5. ALINHAMENTO DOS INICIADORES	20
3.6. PCR <i>SINGLEPLEX</i>	20

3.7. PCR <i>MULTIPLEX</i>	22
3.8. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE	22
3.9. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE HHV-1, HHV-2 e HPV	24
4.2. CONSTRUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR <i>MULTIPLEX</i>	24
4.3. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DA PCR <i>MULTIPLEX</i>	30
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação entre o tipo de HPV e a doença associada.....	10
Quadro 2. Iniciadores empregados na reação de PCR multiplex, com seus respectivos alvos, tamanho do fragmento e sequência.....	21
Quadro 3. Condições de amplificação dos fragmentos alvo	22
Quadro 4. Concentração e volume dos reagentes utilizado nos diferentes protocolos	23
Quadro 5. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 01	24
Quadro 6. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 02	25
Quadro 7. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 03	27
Quadro 8. Testes realizados com diferentes variações no protocolo 02	28
Quadro 9. Diferentes concentrações de DNA testadas no protocolo 02	28
Quadro 10. Protocolo padronizado com os reagentes e concentrações da PCR multiplex para detecção de Papillomavírus humano e Herpesvírus humano Tipo 1 e 2	29
Quadro 11. Condições de amplificação dos fragmentos alvo no protocolo padronizado	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC-H	Células Escamosas Atípicas, não é possível excluir HSIL
ASC-US	Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HEp-2	Células derivadas da carcinoma epidermóide de laringe humana
HHV-1	<i>Herpesvirus humano</i> tipo 1
HHV-2	<i>Herpesvirus humano</i> tipo 2
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana 1
HPV	<i>Papillomavírus Humano</i>
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
ICO	Catalan Institute of Oncology
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgM	Imunoglobulina M
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
LCR	Long Control Region
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
NAT	Teste de Amplificação de Ácido Nucléico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Read Frame
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RD	Células derivadas de rabdomiosarcoma humano
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido Tricloroacético
URR	Upstream Regulatory Region
WHO	World Health Organization

RESUMO

Introdução: O *Papillomavírus humano* (HPV), e os *Herpesvírus humano* 1 e 2 (HHV-1/HHV-2) apresentam semelhanças entre si, como a capacidade de permanecer latente e causar infecções recorrentes. Os testes comumente realizados para o diagnóstico destes patógenos e considerados como padrão ouro, não apresentam uma alta sensibilidade para todos os tipos de infecções. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi padronizar a metodologia de PCR *multiplex* para a detecção da infecção genital pelo HPV, HHV- 1 e 2. **Material e Métodos:** Para a realização dos testes de PCR foram utilizados os iniciadores MY09/MY011 para amplificação da região ORF-L1 do HPV, H1P32/H1M32 para a região RL-2 do HHV-1, e H2M40/H2P4 para a região UL-28 do HHV-2. Foi utilizado DNA extraído de cultivo celular como controle positivo para HHV-1 e 2, e DNA extraído de amostras cérvico-uterinas provenientes de um biobanco para o HPV. Primeiramente, foi realizado uma PCR *singleplex* para cada vírus, para posterior padronização da PCR *multiplex*, onde três protocolos com volumes finais de 25 µL, 50 µL e 100 µL foram utilizados a fim de observar o melhor padrão de amplificação simultânea. **Results:** After analyzing the result of the amplification of the three protocols, the protocol with a final volume of 25 µL was chosen, and in the same several tests for optimization of reaction conditions and cycling were performed. Among these tests, simultaneous amplification of the three viruses was observed by adjusting the concentration of dNTPs, magnesium chloride, Taq DNA polymerase, and the primers. In addition, the DNA concentration of the controls was adjusted over the tests performed, where a minimum detection threshold for HHV-1 of 8.4 ng, for HHV-2 of 28.4 ng, and for HPV of 136.8 ng was observed. **Conclusão:** A técnica padronizada é capaz de detectar e distinguir cada vírus em baixas quantidades de DNA. Nossos resultados corroboram com diversos estudos na literatura que estabelecem um protocolo com soluções práticas para a otimização da PCR *multiplex*, e resolução dos problemas comumente encontrados. A aplicação desta protocolo em uma amostragem cérvico-uterinas recém coletadas, é essencial para a validação do método.

Palavras-chave: HPV, HHV-1, HHV-2, PCR, *multiplex*

ABSTRACT

Introduction: *Human papillomavirus* (HPV) and *Human herpesvirus 1* and 2 (HHV-1 / HHV-2) have similarities to each other, such as the ability to remain latent and cause recurrent infections. The tests commonly performed for the diagnosis of these pathogens and considered as gold standard do not present a high sensitivity for all types of infections. **Objective:** The objective of this study was to standardize the multiplex PCR method for the detection of genital HPV infection, HHV 1 and 2. **Material and methods:** In order to perform the PCR tests were used the MY09 / MY011 primers for amplification of the HPV ORF-L1 region, H1P32 / H1M32 region for the HHV-1 RL-2 region, and H2M40 / H2P4 for the UL-28 region of HHV- 2. DNA extracted from cell culture was used as a positive control for HHV-1 and 2, and DNA extracted from cervico-uterine samples from a biobank for HPV. First, a singleplex PCR was performed for each virus for subsequent standardization of multiplex PCR, where three protocols with final volumes of 25 μ L, 50 μ L and 100 μ L were used in order to observe the best simultaneous amplification pattern. **Results:** After analyzing the amplification results of the three protocols, we chose the protocol with a final volume of 25 μ L, and performed several tests to optimize the reaction and cycling conditions. Among these tests, we observed simultaneous amplification of the three viruses by adjusting the concentration of dNTPs, magnesium chloride, Taq DNA polymerase, and primers. In addition, the DNA concentration of the controls was adjusted over the tests performed, where we observed a minimum detection threshold for HHV-1 of 8.4 ng, for HHV-2 of 28.4 ng, and for HPV of 136.8 ng. **Conclusion:** The standardized technique is able to detect and distinguish each virus in low amounts of DNA. Our results corroborate with several studies in the literature that establish a protocol with practical solutions for the optimization of multiplex PCR, and resolution of the problems commonly encountered. The application of this protocol in a newly collected cervical-uterine sampling is essential for the validation of the method.

Keywords: HPV, HHV-1, HHV-2, PCR, multiplex

1. INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) são um importante problema de saúde pública no mundo e constituem uma das principais causas de doenças agudas, doença inflamatória pélvica, infertilidade feminina e parto prematuro (WHO, 2019). A aquisição dessas infecções se dá através de relações sexuais desprotegidas com o parceiro infectado. Além disso, também podem ser transmitidas de forma vertical, durante o parto normal, aleitamento materno e pela via parenteral (BRASIL, 2015; BELDA et al., 2009)

As IST têm múltiplas etiologias e apresentações clínicas, e causam impacto na qualidade de vida das pessoas, nas relações pessoais, familiares e sociais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais de 1 milhão de IST são adquiridas todos os dias no mundo. Estima-se que mais de 357 milhões de novas infecções ocorram anualmente (BRASIL, 2015; WHO, 2019).

As taxas de prevalência entre adolescentes e adultos jovens são mais altas em mulheres, esta parte da população recebe o diagnóstico de IST com mais frequência que a população masculina. Dentre os agentes infecciosos mais comuns em mulheres estão: *Human papillomavirus*, *Human herpesvirus*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, e *Neisseria gonorrhoeae* (HODGES e HOLLAND, 2018).

1.1. HERPESVÍRUS

1.1.1. Taxonomia

Os *Herpesvírus humano 1 e 2* (*Human alphaherpesvirus 1*, HHV-1 e *Human alphaherpesvirus 2*, HHV-2, segundo a nova taxonomia) são as espécies virais mais estudadas, pois causam infecções persistentes, latentes e recidivas constantes que resultam em lesões originadas no local da infecção inicial (ICTV 2018; WHITLEY e ROIZMAN, 2001).

São pertencentes à família *Herpesviridae*, juntamente com mais de 130 herpesvírus diferentes descritos até o momento. Desses, oito são capazes de infectar humanos, e estão classificados em diferentes subfamílias. Os *Herpesvírus humanos*

1 e 2 estão agrupados na subfamília *Alphaherspervirinae*, gênero *Simplexvirus* (DAVISON et al., 2008; ICTV, 2018).

Caracteristicamente, os herpesvírus apresentam rápido crescimento em cultura de células e ciclo replicativo relativamente curto. Especificamente os *Herpesvírus humano* são altamente espécie-específicos, nos seres humanos estes patógenos são mantidos viáveis sob o aspecto infectivo, por toda a vida do indivíduo, através da habilidade de manter uma infecção latente nos gânglios sensoriais. Embora sejam biologicamente semelhantes, são antigenicamente diferentes. (GELLER et al., 2012; AZAMBUJA, 2004).

1.1.2. Morfologia e organização genômica

O HHV 1 e 2 apresentam-se como uma partícula esférica com um diâmetro que varia de 150 nm a 200 nm, envelopada por um envoltório originado da membrana nuclear, onde estão inclusas as glicoproteínas virais gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM, e gN. Estas glicoproteínas de superfície estão envolvidas na resposta de anticorpos à infecção pelo HHV, gerando importantes respostas imunitárias. Além disso as proteínas gG-1 e gG-2 são utilizadas em testes sorológicos para diferenciar HHV-1 e HHV-2 respectivamente, pois apresentam uma baixa homologia entre si quando comparadas às outras glicoproteínas (LUPI et al., 2010; LEGOFF et al., 2014).

O capsídeo possui formato icosaédrico constituído por 162 capsômeros, que reveste o DNA de fita dupla disposto na forma linear com tamanho entre 150 e 153 kilo pares de base (KpB), além disso possui uma camada mais externa, formada por quatro proteínas virais VP5, VP26, VP23 e VP19C, estas juntas, formam a passagem necessária para saída do DNA do vírus para o exterior (ROIZMAN et al., 2007; SANTOS et al., 2008). Entre o capsídeo e o envelope, existe uma região chamada tegumento, composto por 26 proteínas que participam de diversas etapas do ciclo de replicação viral (CLEATOR e KLAPPER, 2004; LUPI et al., 2010) (Figura 1).

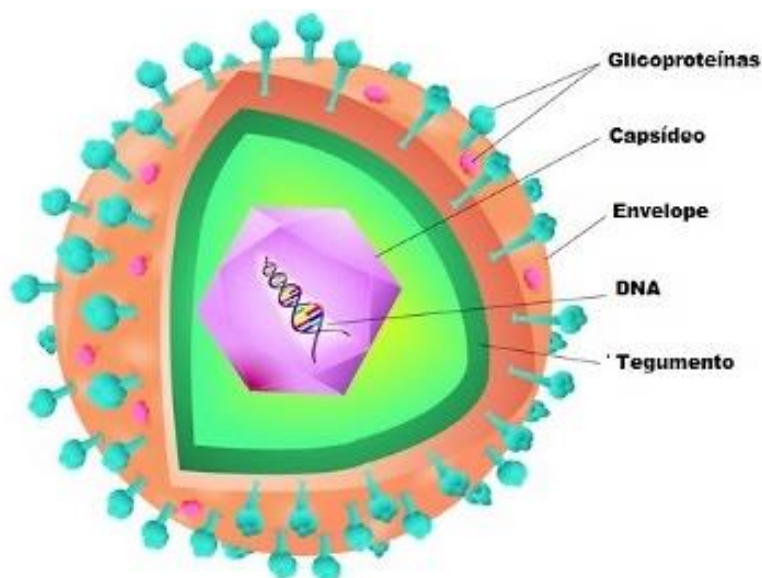


Figura 1 – Estrutura do Herpesvírus. Fonte: Adaptado de: <https://hashimotoshealing.com/the-herpes-virus-and-hashimotos/>.

Na constituição do genoma, duas regiões únicas conhecidas como região UL (*long*) e região US (*short*) estão presentes, além de distintos elementos de repetição denominados RS e RL que flanqueiam respectivamente as sequências US e UL em direções opostas. Cada região do genoma possui sua importância, a região UL codifica diversas proteínas essenciais para a clivagem e empacotamento do DNA, com destaque para UL-15, UL-33 e UL-28. Alguns elementos de repetição, como RL-1, RL-2 e RS-1, também destacam-se pela sua participação na reativação viral (JACOBSON et al., 2006; WATSON et al., 2012)

1.1.3. Manifestações clínicas do herpesvírus

Os *Herpesvírus humano* possuem como locais de infecção a pele e membranas mucosas. O HHV-1 está relacionado às infecções orais, enquanto o HHV-2 está associado às infecções genitais, porém alguns estudos relatam casos de infecção genital pelo HHV-1 e oral pelo HHV-2 (HADDOW et al., 2006; PEÑA et al., 2010, LOWHAGEN et al., 2002).

Apesar do HHV-2 ser o agente responsável pela maior parte dos casos de herpes anogenitais, alguns dados sugerem uma mudança nesse padrão, principalmente em regiões desenvolvidas. Cada vez mais é observado um aumento nas infecções anogenitais causadas pelo HHV-1 em mulheres, homens que fazem sexo com homens (HSH) e pessoas mais jovens. Esta mudança pode ser atribuída à

um declínio das infecções orais por HHV-1 na infância, consequentemente gerando uma população de adolescentes soronegativos, que ao iniciar a vida sexual correm o risco de adquirir HHV-1 anogenitalmente (DURUKAN et al., 2018; GARLAND et al., 2014).

Além disso práticas sexuais como o sexo oral e intercuro vaginal, são importantes fatores de risco para aquisição do HHV-1 em mulheres jovens sexualmente ativas, quando comparado com mulheres inativas (CHERPES et al., 2005).

A transmissão do HHV-1 ocorre principalmente pela saliva, comumente na infância ou adolescência, causando lesões brandas especialmente ao redor dos lábios ou de uma forma mais severa, incluindo a mucosa bucal e gengival, ocasionando úlceras na boca, gengivas e língua (PATEL et al., 2011). Além destas manifestações típicas, o HHV-1 pode gerar uma complicação chamada ceratoconjutivite, derivada da herpes ocular. Em casos mais graves, pode afetar o sistema nervoso central (SNC) causando encefalite, e consequentemente, sequelas neurológicas (PRESCOTT, 2002).

O HHV-2 é transmitido através de relações sexuais, onde a região ano-genital é a principal afetada (COSTELLO et al., 2006). Esse vírus forma úlceras genitais dolorosas no cervix, vagina, vulva, períneo e região peniana, que podem ser acompanhadas por febre, mal estar, uretrite, cistite e adenopatias inguinais localizadas. Complicações como meningite asséptica e retenção urinária são comuns em mulheres (BEAUMAN et al., 2005; BROOKS et al., 2014; FATAHZADEH et al., 2007).

Na infecção genital causada por ambos os vírus, a apresentação clínica dos sintomas é similar, após o período de incubação que varia de 4 a 7 dias, é observado múltiplas lesões nos genitais e/ou na pele adjacente, que podem progredir para pápulas, eritemas, úlceras dolorosas e com crostas, que apresentam resolução de 2 a 3 semanas. No entanto o curso da infecção na maioria dos pacientes, é assintomático, sem lesões visíveis (GROVES, 2016; GNANN e WHITLEY, 2006).

A inoculação inicial acontece em células mucoepiteliais onde se replicam, para posteriormente, migrar através de nervos sensoriais até os gânglios sensoriais dorsais. Na primoinfecção, o vírus permanece latente nos gânglios sensoriais até que

certos eventos causem uma possível reativação viral (COSTELLO et al., 2006; ARDUINO e PORTER, 2007). (Figura 2)

Fatores como estresse físico ou emocional, febre, exposição a raios ultravioleta, dano tecidual e imunossupressão podem ocasionar a recorrência destes vírus de forma sintomática ou assintomática (KOLOKOTRONIS e DOUMAS, 2006; WHITLEY e ROIZMAN, 2001). Em um estudo onde 90 a 95% da população estudada apresentou soropositividade, foi relatada recorrências em 38 a 45% dos indivíduos (CLEATOR e KLAPPER, 2004).

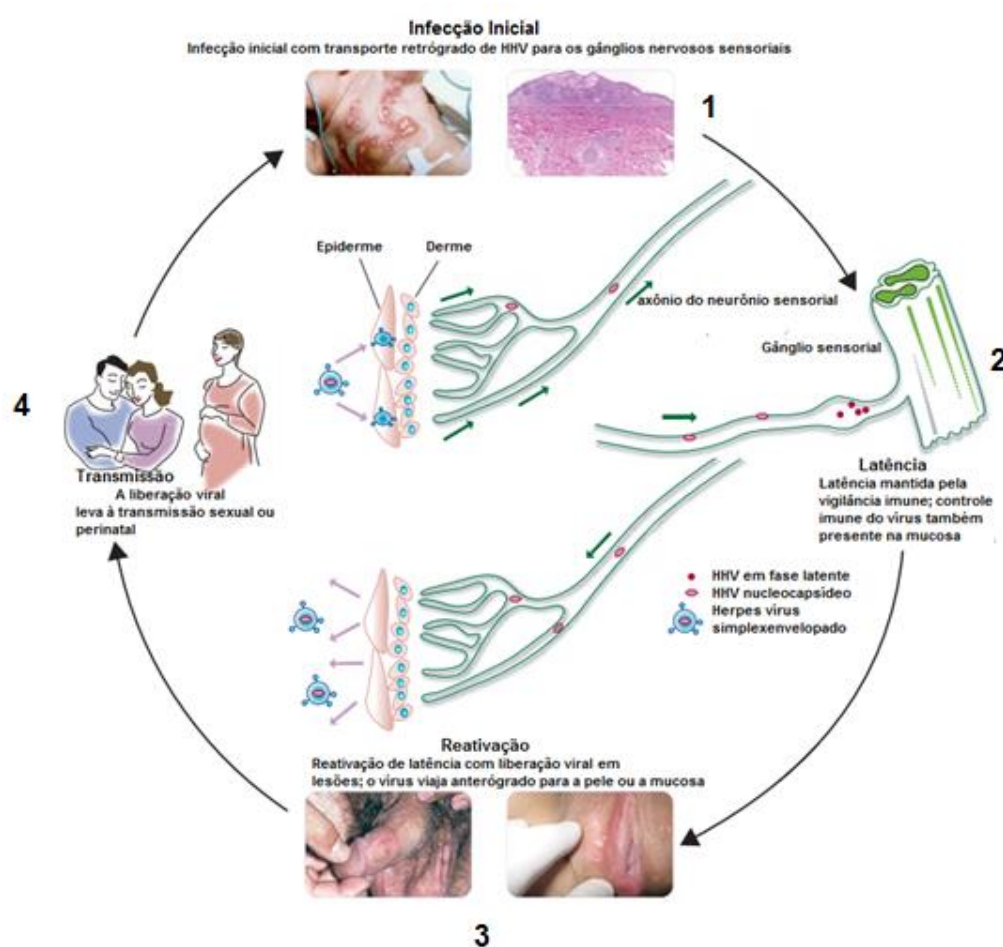


Figura 2 – Ciclo da infecção pelo herpesvírus. Fonte: Adaptado de Gupta, 2007.

As infecções recorrentes são frequentes especialmente em indivíduos imunodeprimidos, onde o vírus se propaga além do gânglio dorsal, resultando em complicações sistêmicas. A presença ou ausência de anticorpos para esses vírus, também influencia nas recorrências e na gravidade e duração das infecções. Indivíduos soronegativos apresentam sinais clínicos mais dolorosos e prolongados na

sua primo-infecção, do que em infecções recorrentes, onde os sintomas tendem a ser mais discretos (SUZICH e CLIFFE, 2018).

1.1.4. Epidemiologia

Ambos os vírus HHV-1 e 2, estão presentes mundialmente, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, infectando apenas seres humanos, sem variação sazonal. Através da sua capacidade de permanecer latente em seus hospedeiros, os seres humanos infectados representam um importante reservatório de HHV, com uma alta transmissibilidade a indivíduos passíveis de infecção (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; LUPI et al., 2010).

A organização mundial de saúde (OMS) estima que mundialmente, 3,7 bilhões de pessoas com idade abaixo de 50 anos, estejam infectadas com HHV-1, desta população, 140 milhões casos são de infecções genitais. No que diz respeito ao HHV-2, 417 milhões de pessoas com idade entre 15 e 49 anos estão infectadas (WHO, 2017).

A população feminina apresenta uma maior prevalência, com aproximadamente 267 milhões de mulheres infectadas pelo HHV-2, enquanto que em torno de 150 milhões de homens apresentam a infecção por HHV-2 (WHO, 2017; LOOKER et al., 2015a). Essa diferença entre os gêneros, pode ser explicado através da taxa de infecção assintomática mais alta entre homens do que em mulheres, visto que o vírus continua presente tanto em secreções salivares quanto em secreções genitais, mesmo na ausência de lesões clínicas aparentes, ocasiona-se uma maior suscetibilidade à infecção para pessoas do sexo feminino (CHERPES et al., 2005; GUPTA et al., 2007; WALD et al., 2000)

No que diz respeito às regiões geográficas, ambos os vírus HHV-1 e HHV-2 apresentaram uma alta prevalência na África, com valores de 87% e 32% respectivamente (LOOKER et al., 2015a; LOOKER et al., 2015b). No Brasil, em 2010 através de um teste tipo-específico ELISA, foi relatado uma prevalência de 67, 2% para o HHV-1, e de 11, 3% para o HHV-2, com as maiores taxas na região Norte do país (CLEMENS e FARHAT, 2002).

Um estudo envolvendo 261 mulheres sexualmente ativas em Natal, Brasil, demonstrou uma prevalência quatro vezes maior de HHV-1 em infecções genitais quando comparado ao HHV-2 nesta população analisada (PEREIRA et al., 2012).

Em infecções genitais ambos os vírus HHV-1 e 2, podem estar presentes simultaneamente com outros agentes de IST. Em um estudo que buscou determinar a prevalência de sete patógenos causadores de IST, em mulheres infectadas pelo *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV-1), o HHV-2 foi um dos patógenos mais comuns, assim como também estava presente no grupo controle de mulheres não infectadas em menor frequência (SOUZA et al., 2013).

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HHV é realizado através da associação das características clínicas com os exames laboratoriais. O padrão ouro para a detecção do HHV, permanece sendo o isolamento/cultivo do vírus em cultura de células, onde é observado o efeito citopático causado pelo HHV. Microscopicamente é possível observar células aumentadas, refratárias e arredondadas, assim como é visto a presença de células epiteliais gigantes multinucleadas com inclusões intracelulares (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; RATNAM et al., 2007).

Apesar de ser o teste preferencialmente escolhido pelos laboratórios, sua sensibilidade depende de diversos fatores como: contexto clínico, tipo e local da lesão, e o transporte da amostra deve ser rápido, resfriado, protegido da luz em meio adequado, assim como seu armazenamento, sendo assim pode variar de baixa a alta (LEGOFF et al., 2014).

No caso de infecções assintomáticas e recorrentes, não se apresenta como um teste confiável, dado que o vírus está presente por um curto período, sendo eliminado em baixas concentrações. Além disso, os resultados demoram a ser disponibilizados para o paciente, visto que a cultura de células é um método laborioso, com um tempo mínimo de 7 a 10 dias, alguns laboratórios utilizam ainda o método de passagem cega na ausência de efeito citopático, prolongando ainda mais a liberação do resultado (LEGOFF et al., 2014; VARELLA et al., 2005)

A detecção de antígenos virais por imunofluorescência é um método utilizado para diagnóstico, e também empregado para confirmação e sorotipagem. Apesar de possuir a mesma sensibilidade do isolamento/cultivo do vírus, apresenta-se como uma técnica mais rápida, vindo a ser utilizada em locais com limitações, e onde as condições de manuseio e transporte da amostra não sejam adequadas para o

isolamento viral. Ainda assim apresenta a restrição da utilidade apenas em pacientes sintomáticos (LEGOFF et al., 2014)

Testes sorológicos para HHV baseados na detecção de anticorpos específicos para glicoproteínas gG-1 e gG-2 também são utilizados para diagnóstico. Outros ensaios sorológicos, que não são baseados na glicoproteína G, detectam predominantemente anticorpos comuns, o que ocasiona uma baixa sensibilidade, e até mesmo uma tipagem incorreta. Testes IgM específicos detectam a infecção precoce em pacientes, mas pode ser negativo durante a doença primária, já na reativação da doença este pode ser positivo, o que seria inviável para a distinção da infecção primária de recorrente, limitando assim o uso deste método (RATNAM et al., 2007; WHITLEY e ROIZMAN, 2001).

Métodos voltados para a biologia molecular, estão sendo cada vez mais utilizados nos últimos dez anos, para detectar e quantificar DNA do HHV. Dentre as diferentes técnicas encontra-se PCR *in house*, PCR em tempo real, PCR seguida por hibridização, além dos kits comerciais (WALD, et al., 2003; ESPY et al., 2000).

O método de PCR permite identificar tanto os vírus HHV-1 e HHV-2 sem distinção, através de iniciadores em comum, assim como identificar especificamente cada um deles, através de iniciadores e sondas específicas – no caso da PCR em tempo real. A PCR é atualmente o teste mais sensível disponível para detecção de HHV, quando comparado com os citados anteriormente, chegam a ser de 11 a 71% superior a cultura de vírus, além de serem os mais rápidos, como em alguns testes comerciais que possuem duração de apenas 1 hora e 30 minutos (KIM et al., 2011; WALD et al., 2003; RAMASWAMY et al., 2004; SCOULAR et al., 2002).

Dentre os métodos de biologia molecular, também podemos citar o teste de amplificação de ácido nucléico (NAT), ambos detectam infecções assintomáticas e sintomáticas, além de serem indicados para todos os tipos de amostras, até mesmo aquelas que já passaram do estágio vesicular, com uma especificidade que chega a 100%. (WALD et al., 2003; COYLE et al., 1999; RATNAM et al., 2007). As únicas desvantagens que estes métodos apresentam são a necessidade um laboratório especializado, a padronização e a validação para todos os tipos de amostras, além do custo ser relativamente alto, principalmente no caso da PCR em tempo real (LEGOFF et al., 2014).

1.1.6. Tratamento

Os medicamentos utilizados no tratamento da infecção por HHV 1 e 2 auxiliam na prevenção das erupções e no tempo da doença, no entanto, sem possibilidade de cura. O tratamento pode ser de modo episódico ou a longo prazo, com intuito de reduzir o tempo da doença, o risco de transmissão sexual, e a prevenção das lesões (PENELLO et al., 2010, LUPI et al., 2010; RANG et al., 2016).

O Aciclovir é um análogo de guanossina, inibidor da síntese do DNA viral, específico para infecção pelas espécies do gênero *Simplexvirus*, considerado a medicação padrão, atua acelerando a melhora e cicatrização das lesões, e impede que outras novas se manifestem. Devido a sua baixa disponibilidade (20%) e meia-vida curta, exige uma frequente dosagem (EVANS et al., 2013).

Outro medicamento, que apresenta maior disponibilidade e menor frequência posológica, é o Valaciclovir, éster L-valina do Aciclovir (pró-droga), também inibidor da DNA polimerase, apresenta alta eficácia na redução da duração de surtos. O Famciclovir é um análogo de purina, pró-droga do Penciclovir com a melhor biodisponibilidade e absorção e uma baixa frequência de administração. Estes são os antivirais mais utilizados, com mecanismo de ação e eficácia semelhantes no tratamento da infecção primária, e recorrências. Possíveis efeitos colaterais em caso de toxicidade são esperados, como: náuseas, diarreia, cefaleia, dor abdominal e disfunção renal (BRADY e BERNSTEIN, 2004; MORFIN e THOUVENOT, 2003).

1.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO

1.2.1. Taxonomia

Os papillomavírus, constituem um grupo de vírus que infectam diversos vertebrados e são altamente espécie-específicos. Pertencem à família *Papillomaviridae*, no qual já foram descritos diversos gêneros e espécies, que variam segundo sua associação com patologias e lesões clínicas, tropismo celular e risco oncogênico (ICTV, 2018).

O *Papillomavirus humano* (HPV) é membro desta família e, possui cerca de 200 tipos sequenciados e identificados. Os HPVs identificados como de baixo e alto risco oncogênico, encontram-se no gênero *Alphapapillomavirus* (VAN DOORSLAER

et al., 2018; SMITH et al., 2007). Aqueles que são considerados de alto risco oncogênico, estão frequentemente associados às lesões precursoras de câncer, sendo representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. Já os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108 são tidos como de baixo risco, geralmente associados aos condilomas acuminados. Os demais, também de interesse clínico, estão agrupados nos gêneros Beta e *Gammapapillomavirus* (DE VILLIERS et al., 2004; FRAZER et al., 2006) (Quadro 1).

Quadro 1. Relação entre o tipo de HPV e a doença associada.

Tropismo	Doença	Tipo de HPV
Cutaneotrópico (Baixo Risco)	Verrugas plantares	1, 2, 4, 63
	Verrugas comuns	2, 1, 3, 7, 4, 10, 26, 27, 28, 29, 41, 57, 65, 77
	Verrugas vulgares (planas)	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
	Outras lesões cutâneas (exs.: cistos epidérmicos, carcinoma da laringe)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 82, 73
	Epidermodisplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
	Papilomatose respiratória recorrente	6, 11
	Papilomas/Carcinomas conjuntivos	6, 11, 16
	Condiloma acuminado (verrugas genitais)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Mucotrópico (Alto risco)	Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) x Não específico	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
	x Baixo risco (NIC I)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 51, 52, 74
	x Alto risco	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70
	Carcinoma Cérvico-Uterino	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 66, 68, 70

(Fonte: Adaptado de Souto, 2005)

1.2.2. Morfologia e organização genômica

O HPV é um vírus DNA não envelopado com diâmetro de 52 a 55 nm, com um capsídeo icosaédrico, capaz de infectar pele e mucosas de humanos. Possui o genoma formado por uma única molécula circular de DNA de dupla fita, com cerca de 8.000 pares de bases (pb) e duas regiões codificantes principais classificadas em: região precoce “E” (do inglês *early*) e região “L” (do inglês *later*), juntas são denominadas ORF (*open read frames*) (Figura 3.) (DOORBAR, 2005).

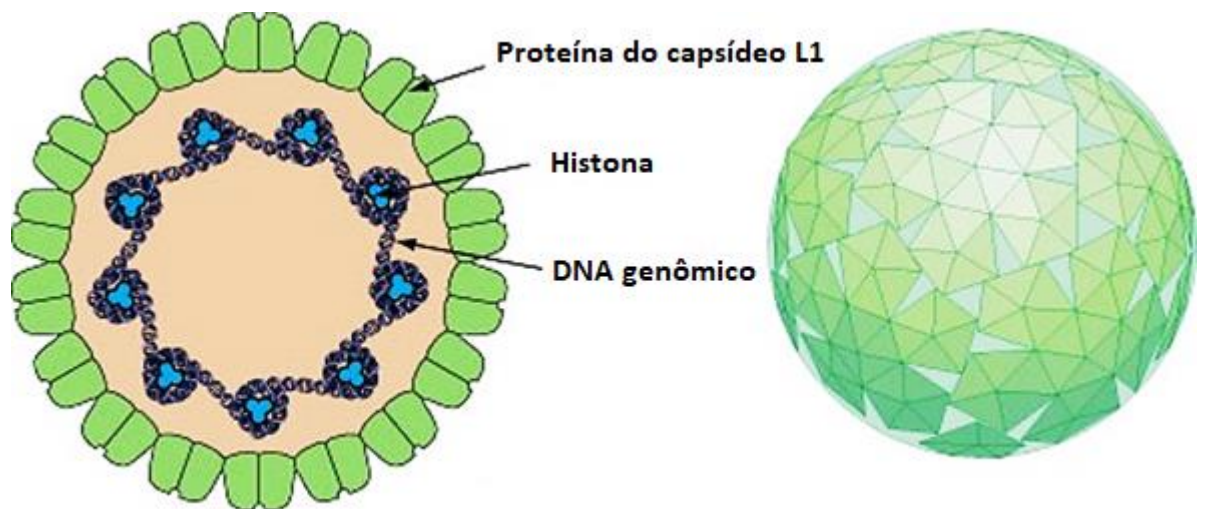


Figura 3 – Estrutura do HPV. Fonte: Adaptado de <https://viralzone.expasy.org>

Na região L encontram-se os genes L1 e L2 que codificam as proteínas também chamadas L1 e L2. Destas proteínas, a L1 é a principal proteína básica e representa 80% das proteínas do capsídeo, além de possuir um papel importante na montagem viral. A proteína L2, conhecida como a menor proteína básica, juntamente com a L1 auxilia no empacotamento do DNA viral dentro do vírion (LETO et al., 2011; BRIANTI et al., 2010).

Já na região E, os diferentes genes classificados de E1 a E8 estão relacionadas à transcrição, replicação viral e controle do ciclo celular, dentre estes, os genes E6 e E7 codificam proteínas associadas ao progresso das lesões a malignidade. O genoma viral ainda possui, a região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), responsável por regular os processos de replicação e transcrição viral (Figura 4) (FEHRMANN e LAIMINS, 2003; SZOSTEK et al., 2006).

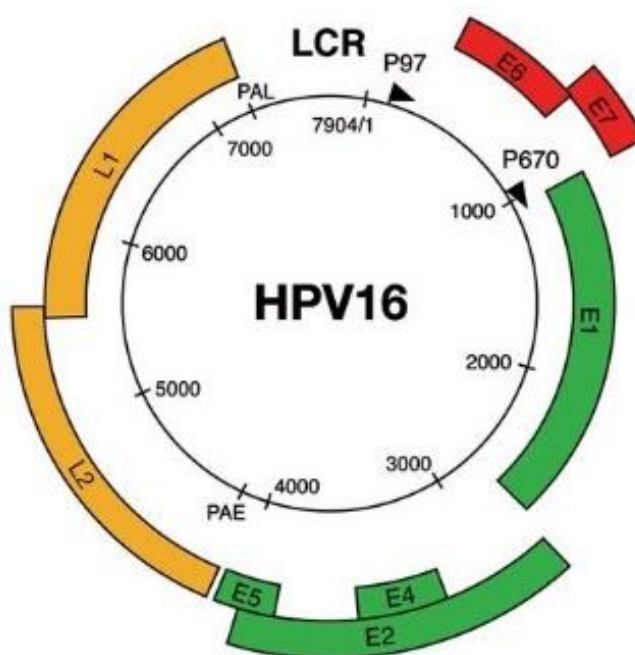


Figura 4 – Representação esquemática do genoma do HPV. Fonte: Adaptado de Doorbar, 2012.

1.2.3. Manifestações clínicas

O início da infecção pelo HPV ocorre com a entrada de partículas virais na superfície epitelial, através de microabrasões ou traumatismos na pele e mucosas. Esse processo infeccioso pode resultar em lesões evidentes, como verrugas, ou não (DOORBAR, 2005; PINHEIRO et al., 2013). Desta forma a infecção se apresenta de três formas diferentes: latente - o diagnóstico é realizado apenas por métodos moleculares, sem sinais clínicos; subclínica – não há sintomas clínicos, porém métodos citológicos ou histopatológicos são úteis para detecção; clínica – presença de lesões visíveis ao exame clínico e sintomas apresentados pelo paciente (PINTO, 2001; RUSSOMANO et al., 2000).

A transmissão do HPV ocorre através do contato direto ou indireto pele a pele com o indivíduo que possui a lesão, por via sexual, tanto através de penetração quanto por outros tipos de contato genital, e materno-fetal durante o período gestacional ou parto (GAVILLON et al., 2010; QUEIROZ et al., 2007). O período de incubação viral pode variar de 3 meses para até 18 meses (SILVA et al., 2016).

Os diferentes tipos de HPV estão agrupados em duas categorias principais, os que possuem tropismo pelos tecidos epiteliais cutâneos, e os que apresentam tropismo pelo epitélio das membranas mucosas (SANCLEMENT e GILL, 2002). O tipo

cutâneo se manifesta na população em geral através de verrugas superficiais, ao infectar principalmente a pele da mão e dos pés (RÁCZ, 2004). Os tipos mucosos são classificados em subtipos de baixo e alto risco oncogênico, de acordo com o grau de associação ao câncer cérvico-uterino, e também estão associados aos condilomas planos e acuminados (MUÑOZ et al., 2003; SCHEURER et al., 2005).

A persistência ou eliminação da infecção, assim como a regressão das lesões, depende de fatores inerentes ao vírus e ao hospedeiro, como a carga viral envolvida, defeitos no controle da replicação do vírus, imunossupressão, fatores genéticos e a presença de coinfeções (SCHEURER, et al., 2005; GRAHAM e HERRINGTON, 2000).

1.2.4. Epidemiologia

A infecção genital pelo HPV é considerada a mais frequente no mundo todo, com aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo apresentando esta infecção em algum período da vida, correspondendo a uma prevalência de 10,4% (TORRE et al., 2017).

É estimado que 50% da população com vida sexual ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV. Dentre a população feminina estima-se que 80% das mulheres terão esse contato até os 50 anos de idade, com as maiores taxas encontradas em mulheres mais jovens e diminuindo com o grupo da meia idade, com ocorrência de um segundo pico em torno da quinta e sexta década de vida (BURCHELL et al., 2006; SANJOSÉ et al., 2007).

Foi observado uma prevalência mundial da infecção por HPV em mulheres sem anomalias cervicais de 11-12% com as maiores taxas observadas na África Subsaariana (24%), seguida pela Europa Oriental (21%) e América Latina (16%). Quando observado em mulheres com patologia cervical, a prevalência atinge cerca de 90% em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 e câncer invasivo (FORMAN et al., 2012). Os tipos 16 e 18 são responsáveis por 50-55% dos casos de lesões de alto grau, e observado em 70% dos câncer cérvico-uterino no mundo todo (ICO, 2017).

No Brasil, os números variam em torno de 21 a 48% na população em geral, sendo que a partir desta porcentagem inicial, 88,2% das mulheres foram positivas

para pelo menos um tipo de HPV de alto risco (CARVALHO et al., 2003; FEDRIZZI et al., 2008; FERNANDES et al., 2009).

Noronha, em 2006, analisou 491 amostras cervicais de mulheres assintomáticas para o HPV em que buscaram atendimento em Belém, e constatou uma prevalência da infecção por HPV de 44,1%, no grupo de mulheres com esfregaço cervical apresentando alterações citológicas, comparado a 8,3% no grupo de mulheres com citologia dentro dos limites da normalidade (NORONHA et al., 2006).

Em mulheres ribeirinhas do estado do Pará, foi observado uma prevalência de 16,4% de HPV, com 8 casos de HPV-16 (2,3%) e 5 casos de HPV-18 (1,4%). Dentre as 353 mulheres participantes, aproximadamente 70% nunca tinha realizado o exame preventivo de Papanicolau (DUARTE et al., 2017).

A co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis está associado a altas taxas de prevalência, assim como ao desenvolvimento de câncer cérvico-uterino (CASTELLSAGUÉ et al., 2002). Em um estudo realizado com sete casos-controle para avaliar a presença do HHV-2 simultaneamente com o HPV, entre as mulheres com detecção positiva do DNA de HPV, a soropositividade para HHV-2 foi associada a um risco aumentado de carcinoma escamoso, adeno ou adeno-escamoso (SMITH et al., 2002).

1.2.5. Diagnóstico

A análise citológica cervical é uma das ferramentas mais utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo HPV. Este teste empregado como triagem para a infecção pelo HPV e lesões associadas ao câncer cérvico-uterino, reduziu significativamente as taxas de morbidade e mortalidade por esta doença, principalmente em países que implementaram a triagem citológica em grande escala (EL-ZEIN et al., 2016; JUNG et al., 2004).

O material proveniente da ectocérvice e endocérvice uterina é analisado microscopicamente em busca de alterações celulares benignas, pré-malignas, malignas, e atipias celulares, posteriormente são classificados de acordo com Bethesda (2001), como LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau), HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau), ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado), ASC-H (células escamosas atípicas, não é possível excluir HSIL), e carcinoma de células escamosas (BRASIL, 2006; DERCHAIN et al, 2005).

Além desta classificação, é sugerido por diversos autores, a utilização de critérios morfológicos clássicos - como a coilocitose e diqueratose – que caracterizam as lesões oriundas da infecção pelo HPV (IRIE et al., 2001; KANESHIMA et al., 2003; JORDÃO et al., 2003).

Ainda que seja o principal método para diagnóstico das lesões cervicais relacionadas ao HPV, sua sensibilidade é limitada devido ao número significativo de resultados falsos negativos e a variação da interpretação dos resultados entre diferentes observadores. Além disso, através da citologia não é possível distinguir quais alterações podem regredir espontaneamente ou progredir ao câncer, e realizar a tipagem do HPV, o que torna necessário a realização de exames complementares para um diagnóstico completo (FARIA et al., 2008; BRINGHENTI et al., 2010; MARIANI et al., 2017).

A pesquisa por testes moleculares destaca-se como método alternativo, pela sua alta sensibilidade e possível identificação de tipos virais específicos (GIRIANELLI et al., 2004; DO CARMO e FIORINI, 2007). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é descrita como um teste altamente sensível e eficaz na identificação do DNA viral. Diversos iniciadores que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes podem ser utilizados, assim como sondas tipo-específicas ou sequenciamento de DNA, o que auxilia no reconhecimento dos grupos de HPV de alto e baixo risco. Além disso é possível identificar diferentes regiões do genoma do vírus e realizar a quantificação em um único ensaio através da PCR em tempo real. (GRADÍSSIMO e BURK, 2017; DO CARMO e FIORINI, 2007).

Apesar de apresentarem uma alta sensibilidade, ainda possuem um alto custo e demanda de tempo e estrutura. Dessa forma, o exame citológico permanece como método de rotina, e quando possível, os testes moleculares são aplicadas para o rastreio de neoplasias cervicais ou das lesões precursoras desta patologia (BOSCH et al., 2002; SERMAN, 2002).

1.2.6. Tratamento

As opções de tratamento para a infecção pelo HPV variam de acordo com as manifestações clínicas do paciente. Deve ser avaliado, o tipo, número e localização das lesões, assim como a sua associação com a neoplasia cérvico-uterina (FATHI e TSOUKAS, 2014). Há uma ampla possibilidades de terapias disponíveis no mercado,

como tratamentos químicos (TCA, podofilina), físicos (crioterapia, laser, eletrocirurgia, antivirais e/ou imunomoduladores (interferon beta e gama, imiquimod, cidofovir), entre outros. No entanto, estes tratamentos possuem a finalidade de controlar as manifestações clínicas da infecção pelo HPV, haja visto que não é possível a eliminação definitiva do vírus (MARANA et al., 1999; BURD, 2003).

Dessa forma, a criação de medidas profiláticas contra o HPV é necessária para o controle da disseminação do vírus. O desenvolvimento de vacinas, tanto profilática, como terapêutica, está sendo amplamente estudado nas últimas décadas (MANSI, 2007). Atualmente no Brasil, a vacina quadrivalente recombinante Gardasil®, do Laboratório *Merck Sharp & Dohme* está disponível no SUS, sendo indicada para meninas de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos; pessoas que vivem com HIV; e pessoas transplantadas na faixa etária de 9 a 26 anos. A vacina protege contra o HPV de baixo risco (tipos 6 e 11, que causam verrugas anogenitais) e de alto risco (tipos 16 e 18, que causam câncer de colo uterino) (POERSCHKE DE QUEVEDO et al., 2016).

1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA A CO-INFECÇÃO ENTRE HPV, HHV-1 E 2

As infecções genitais causadas pelo HPV, HHV-1 e 2 estão intrinsecamente relacionadas. Esses patógenos podem ser transmitidos sexualmente, infectam o mesmo tipo celular, possuem capacidade de permanecer latente, podem causar infecções recorrentes, além do que, as infecções orais e genitais por HHV podem ser fatores predisponentes para a infecção pelo HPV. (ZHAO et al., 2012; GUIDRY e SCOTT; 2017).

Esses fatores em comum aumentam a possibilidade de interação entre os vírus, o que pode influenciar no surgimento de lesões cervicais, e até mesmo em progressão neoplásica, uma vez que, a inflamação local causada pelo HHV, pode contribuir para a progressão da lesão cervical originada pelo HPV (AMORIM et al., 2017; MEYERS et al., 2003).

A presença de mais de um desses vírus na cérvix, especialmente HHV-2 e HPV, aumenta o risco de desenvolvimento do câncer cérvico-uterino quando comparado com mulheres infectadas com apenas um vírus (HILDESHEIM et al., 1991). A detecção desta co-infecção foi significativamente maior em casos de

neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma de células escamosas, quando comparado com tecidos cervicais normais (ZHAO et al., 2012).

O HHV-1 também já foi associado ao HPV em um estudo que relatou uma prevalência significativamente mais alta na detecção de HHV-1, quando comparado a outros patógenos, em amostras cérvico-uterino positivas para HPV de alto risco (FINAN et al., 2006).

No entanto, os estudos que buscam demonstrar a associação entre estes vírus, apresentam resultados conflitantes (LI e WEN, 2017; SHANEHSAZZADEH et al., 2014; DAHLSTROM et al., 2011; LEHTINEN et al., 2002). Um fato em comum entre os estudos que não apresentam associação entre HHV e HPV, é o uso de métodos sorológicos para a detecção viral. Estes testes, com algumas exceções, não são considerados altamente sensíveis, em particular o ELISA para a glicoproteína G-2 do HHV (RIBES et al., 2001).

Ainda neste tipo de estudo, alguns autores realizam testes moleculares para a detecção do HPV e testes sorológicos para a detecção do HHV, o que requer mais tempo, e torna a metodologia trabalhosa e extensa (SMITH et al., 2002; ZHAO et al., 2002; AGYEMANG-YEBOAH FRANCIS et al., 2018).

Partindo desse pressuposto, o desenvolvimento de uma metodologia capaz de diagnosticar simultaneamente os três patógenos em amostras cervicais, seria de extrema importância, visto que a interação entre esses vírus transmitidos sexualmente já foi descrito na literatura, porém o diagnóstico acontece majoritariamente de forma individual (AMORIM et al., 2017; PÉREZ et al., 2006; SHANEHSAZZADEH et al., 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e eficaz, cada vez mais utilizada na rotina de laboratórios de diagnóstico. Entre as poucas limitações que esse método apresenta, destaca-se o custo elevado, e a necessidade de padronização de protocolos para os diferentes patógenos (BARTLETT e STIRLING. 2003; ELNIFRO et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar a metodologia de PCR *multiplex* para a detecção da infecção genital pelo *Papillomavírus humano*, e *Herpesvírus humano* tipo 1 e tipo 2.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma PCR *multiplex* para a detecção da infecção genital pelo *Papillomavírus humano*, e *Herpesvírus humano* tipo 1 e tipo 2.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do método desenvolvido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo metodológico-descritivo, no qual foi empregado a técnica de PCR *multiplex* para detecção simultânea dos *Herpesvírus humano 1, 2* e *Papillomavírus humano*.

Por se tratar de um estudo metodológico, no qual não houve coleta de dados e amostra biológica proveniente de seres humanos, este estudo dispensa apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

3.2. SELEÇÃO DOS CONTROLES DE HHV-1, HHV-2 e HPV, E EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO.

Para a padronização da metodologia de PCR *multiplex*, foi utilizado como controle positivo material proveniente de vírus isolados em cultivo celular e amostras de DNA extraído positivas para os vírus em questão.

Para o HHV-1 e 2 foi utilizado DNA extraído de células HEp-2c e RD inoculadas e caracterizadas molecularmente como positivas, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Enterovírus do Instituto Evandro Chagas (IEC). Para o HPV foi utilizado DNA extraído de amostras cérvico-uterinas previamente diagnosticadas através de biologia molecular como positivas, selecionadas de um biobanco disponível no Laboratório de Virologia, ICB, UFPA.

O material genético foi extraído através da metodologia de fenol-clorofórmio e através do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen).

Na metodologia de fenol-clorofórmio, a etapa de lise de hemácias não foi realizada, e a extração começou diretamente na etapa de lise de leucócitos com proteinase K. Após a precipitação de proteínas, foi realizado a etapa com fenol-clorofórmio, para posterior visualização do pellet de DNA com o uso de isopropanol gelado. Posterior a essa etapa o sobrenadante foi descartado, e o tubo com o *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70%, e após secagem do mesmo, o DNA foi hidratado com 50 µL de H₂O livre de RNase e DNase e armazenados a -20°C.

A extração realizada através do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) utiliza o princípio da purificação de ácido nucleico à base de membrana de sílica. O protocolo foi aplicado de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen).

3.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO

A quantificação e o grau de pureza do DNA genômico extraído foram determinadas por densidade óptica no equipamento *NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific)*. A concentração de DNA foi dada pela medida da absorbância no comprimento de onda de 260nm, em ng / μ L.

Na avaliação da pureza, foi determinada a razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280nm e 260/230nm. O valor de referência utilizado para a pureza do DNA é de $\leq 1,8$, assim quanto maior a razão, maior a pureza da amostra.

Aproximadamente 1 μ L do DNA extraído foi utilizado, e a leitura foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4. ESCOLHA DOS INICIADORES

A padronização inicial da PCR *multiplex* seguiu os procedimentos propostos por Henegariu, 1997, onde o primeiro procedimento realizado incluiu a escolha dos iniciadores utilizados na reação conforme apresentado no Quadro 2. Os iniciadores empregados para detecção dos herpesvírus foram descritos previamente por Markoulatos e colaboradores e os de HPV por Bernard e colaboradores e De Roda-Husman e colaboradores (BERNARD et al., 1994; DE RODA-HUSMAN et al., 1995; HENEGARIU et al., 1997; MARKOULATOS et al., 2001; DRUCE et al., 2002).

3.5. ALINHAMENTO DOS INICIADORES

Após a escolha dos iniciadores, foi realizado um alinhamento com o auxílio do programa *BLAST (Blast Local Alignment Search Tool)* para analisar a existência de possíveis sequências semelhantes entre os iniciadores selecionados para o estudo, e testar a possibilidade de interações entre os mesmos.

3.6. PCR SINGLEPLEX

As amostras de HHV-1, HHV-2 e HPV utilizadas como controle positivo foram primeiramente amplificadas individualmente nas condições de reação e temperatura específicas à cada uma, para que assim fosse confirmado a detecção positiva de cada vírus, para posterior uso como controle. Foram utilizados protocolos padronizados para a identificação de cada vírus, e analisada a condição de ciclagem e concentração

dos reagentes ideal para todos, para que assim o ensaio de PCR *multiplex* fosse realizado.

No protocolo padronizado para HHV-1 e HHV-2, para cada reação foi utilizado 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 2.0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0.4 mM de dNTPs, 0.4 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, EUA), 10 pmol de cada iniciador e 100 ng do DNA extraído em um volume final de 25 μ L. Um controle negativo foi utilizado em todas as reações.

No protocolo padronizado para HPV, foi utilizado um volume final de 50 μ L contendo 200 ng de DNA extraído; 0.8mM de dNTPs; 10 pmol de cada iniciador, 2,5 mM de $MgCl_2$; 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 e 1 U de Taq polimerase.

As condições de amplificação para cada fragmento alvo está descrita no Quadro 3. Todas as amplificações foram realizadas no equipamento *Termociclador Peltier Thermal Cycler* (Biocycler, USA). Os resultados foram observados após a eletroforese dos produtos amplificadas conforme metodologia descrita no item 3.9.

Quadro 2. Iniciadores empregados na reação de PCR multiplex, com seus respectivos alvos, tamanho do fragmento e sequência.

Vírus	Iniciadores	Região Alvo	Tamanho do Amplicon (pb)	Temperatura de Anelamento	Sequência do Primer
HHV-1	H1P32	RL-2	143	52°C	5'-TGGGACACATGCCTTCTTGG-3'
	H1M32				5'- ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC -3'
HHV-2	H2M40	UL 28	226	45°C	5'-GTACAGACCTTCGGAGG-3'
	H2P4				5'-CGCTTCATCATGGGC-3'
HPV	MY09	ORF-L1	450	56°C	5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3'
	MY011				5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'
	GP5+	ORF-L1	150	56°C	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
	GP6+				5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

Quadro 3. Condições de amplificação dos fragmentos alvo.

Sistema	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Nº de ciclos Etapa 2-4	Etapa Final
HHV-1 e HHV-2	95°C	94°C	60°C	72°C	40 ciclos	72°C
(RL 2 e UL 28)	3 min	30 seg	60 seg	30 seg		10 min
HPV	95°C	95°C	56°C	72°C	40 ciclos	72°C
(ORF L1)	5 min	1 min	1 min	1 min		10 min

3.7. PADRONIZAÇÃO DA PCR *MULTIPLEX*

Na padronização da PCR *multiplex* foram três protocolos, descritos no quadro 4, com diferentes ajustes em cada um deles, para a seleção do mais adequado considerando concentração de reagentes, condição de ciclagem quantidade de DNA aplicado, e amplificação simultânea dos *loci* escolhidos para este estudo.

Foram testados os volumes finais: 25 µL, 50 µL e 100 µL. A quantidade de água aplicada na reação foi variável de acordo com as modificações nas quantidades dos demais reagentes. A concentração final do Tampão PCR foi proporcionalmente mantida em todas as reações. Em todas as reações, utilizamos reagentes (*Taq* DNA Polimerase, Tampão PCR e Cloreto de Magnésio) da marca *Invitrogen (ThermoFisher Scientific)*.

3.8. AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE

A avaliação da especificidade da reação foi realizada empregando-se controles positivos dos vírus varicela-zoster, Epstein-Barr, citomegalovírus, poliomavírus e HHV-6, todos sabidamente negativos para HHV-1, HHV-2 e HPV.

A sensibilidade foi avaliada através de um ensaio às cegas de 20 amostras, ou seja o avaliador do teste não possuía o conhecimento do diagnóstico prévio das amostras. As amostras foram divididas da seguinte forma: 5 negativas para todos os vírus, 5 positivas somente para HHV-1, 5 positivas somente para HHV-2 e 5 positivas somente para HPV. As amostras de DNA positivas para os herpesvírus foram

provenientes de isolamento em cultura celular, e aquelas positivas para o HPV foram provenientes do biobanco de amostras cérvico-uterinas.

Os resultados da PCR *multiplex*, foram comparados com os resultados individuais de cada amostra, e foram avaliados a detecção do HHV-1, HHV-2 e HPV, assim como a concentração mínima e máxima.

Quadro 4. Concentração e volume dos reagentes utilizado nos diferentes protocolos.

	Protocolo 01	Protocolo 02	Protocolo 03
Reagente	Volume (µL)	Volume (µl)	Volume (µl)
H ₂ O	Variável	Variável	57,7
Tampão PCR 1X	5,0	2,5	10
MgCl ₂ (50mM)	Variável	Variável	2
Iniciadores 5' (10 pmol)	1,0	Variável	2
Iniciadores 3' (10 pmol)	1,0	Variável	2
dNTPs (10 mM)	Variável	Variável	8
Taq DNA polimerase	0,3	Variável	0,3
DNA	Variável	Variável	10
Volume Final	50	25	100

3.9. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% ou 2,5%. A corrida foi realizada utilizando tampão TAE 1x, em cuba de eletroforese horizontal a 100 v por 45 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados em brometo de etídio a 1µg/mL, e a visualização foi realizada mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta. Os resultados foram registrados em sistema de fotodocumentação (Major Science).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA DE HHV-1, HHV-2 e HPV

Na avaliação de cada amostra controle submetidas a PCR de forma individual, conforme protocolo específico de cada vírus, houve amplificação de um único fragmento no tamanho esperado, ou seja 143 pb para HHV-1, 226 pb para HHV-2, e 450 pb para HPV, observando-se bandas de amplificação específica para cada um destes.

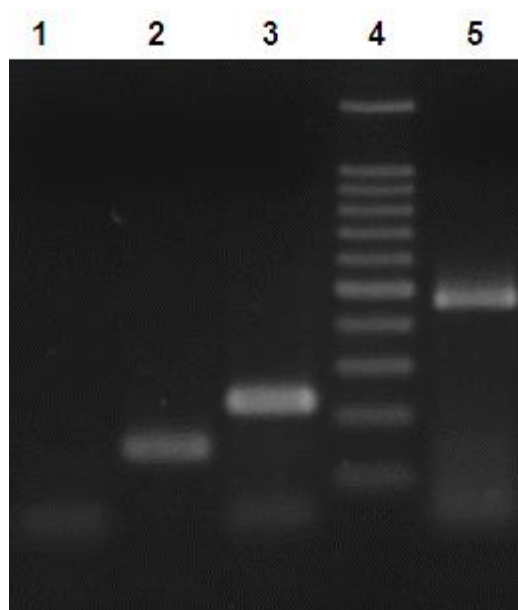


Figura 5. Foto do gel de agarose a 2% com os produtos da PCR individual para cada vírus, corado com brometo de etídio. Legenda: **1** – controle negativo. **2** – HHV-1. **3** – HHV-2. **4** – marcador de peso molecular de 123 pb. **5** – HPV.

4.2. CONSTRUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PCR *MULTIPLEX*

Após a validação da detecção dos três vírus na PCR individual, foi iniciada a etapa de construção do protocolo para a PCR multiplex. O protocolo inicial para a reação *Multiplex* foi realizado com base nas condições de reação e amplificação individual de cada vírus. Nesta reação foi utilizado tampão de PCR 1X, 2 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,8 mM de dNTPs, 0,03 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), 0,2 pmol de cada iniciador e diferentes concentrações de DNA para cada vírus (Quadro 5) em um volume final de 50 μ L. Um controle negativo foi utilizado em todas as reações, assim como um pool de amostras positivas com o DNA extraído de cada vírus: HHV-1, HHV-2 e HPV.

Quadro 5. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 01.

	Concentração individual (ng)	Concentração no <i>pool</i> (ng)
HHV-1	1459.6	291.92
HHV-2	162.2	324.4
HPV	1247.2	249.2

As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 1 minuto, 56°C a 1 minuto, 72°C a 1 minuto com extensão final de 10 minutos a 72°C. Os resultados foram satisfatórios em relação à amplificação de HHV-1 e HPV, porém o mesmo não foi observado no que diz respeito ao HHV-2, onde foi visualizado a presença de uma banda inespecífica (Figura 5).

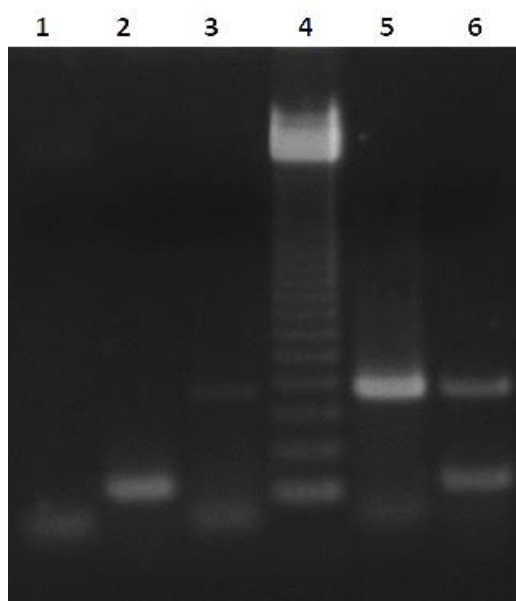


Figura 5. Foto do gel de agarose a 2% com os produtos de PCR do protocolo 01, corado com brometo de etídio.

Legenda: **1** – controle negativo. **2** – HHV-1. **3** – HHV-2. **4** – marcador de peso molecular de 123 pb. **5** – HPV. **6** – Pool de amostras HHV-1, HHV-2 E HPV.

Após este resultado diversos testes foram realizados para a amplificação do HHV-2, com variações na temperatura de anelamento (56°C, 57°C, 54°C, 50°C), concentração de dNTPs (0,2 mM, 0,8 mM cada base), concentração de cloreto de magnésio (1.4 mM e 2 mM) e na concentração de DNA utilizado (162.2 ng, 243.3 ng, 324.4 ng). Apesar disso, a amplificação manteve-se ineficaz, e por esse motivo optou-se pela realização de um segundo protocolo.

Para a realização do protocolo 02, primeiramente foi utilizado tampão de PCR 1X, 1,4 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,4 mM de dNTPs, 0,06 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,4 pmol de cada iniciador, em um volume final de 25 μ L. Este teste também foi realizado com o uso de diferentes amostras de DNA, as concentrações utilizadas estão descritas abaixo (Quadro 6).

Quadro 6. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 02.

	Concentração individual (ng)	Concentração no pool (ng)
HHV-1	8.4	8.4
HHV-2	357.4	536.1
HPV	540.6	720.8

As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 segundos, 60°C a 20 segundos, 72°C a 30 segundos com extensão final de 8 minutos a 72°C.

Neste protocolo, o resultado não correspondeu ao esperado. Foi visualizado uma baixa eficácia na amplificação do fragmento correspondente ao HPV, além da ausência dos fragmentos correspondentes ao HHV-2 e ao HPV no pool de amostras, e a presença de dímeros de primers (Figura 6).

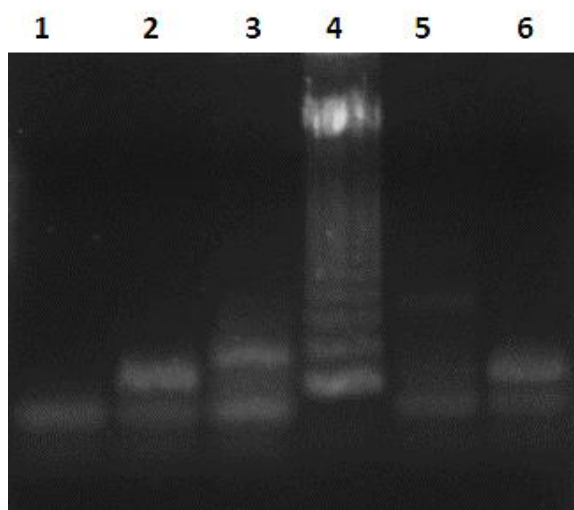


Figura 6. Foto do gel de agarose a 2% com os produtos de PCR do protocolo 02 – teste 01, corado com brometo de etídio. Legenda: **1** – controle negativo. **2** – HHV-1. **3** – HHV-2. **4**. Peso molecular de 123 pb. **5** – HPV. **6** – Pool de amostras (HHV-1 + HHV-2 + HPV).

A partir desse resultado, o protocolo 03 com um volume final de 100 μ L foi testado, buscando a melhora na visualização dos produtos amplificados. Na reação foi utilizado: tampão de PCR 1X, 1 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,2 mM de dNTPs, 0,03 U de *Taq* DNA Polimerase, 0,2 pmol de cada iniciador, e diferentes concentração de DNA para cada vírus. (Quadro 7). Modificamos as condições de ciclagem para desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 1 minuto, 60°C a 1 minuto, 72°C a 1 minuto com extensão final de 8 minutos a 72°C.

Quadro 7. Concentração de DNA em nanogramas utilizada no protocolo 03.

	Concentração individual (ng)	Concentração no <i>pool</i> (ng)
HHV1	12.6	8.4
HHV2	536.1	357.4
HPV	901.0	901.0

Neste protocolo apenas a amplificação do HHV-1 foi obtida, além da visualização de bandas inespecíficas (Figura 7), com base nisso, a realização de testes para otimização deste protocolo foram descartados.

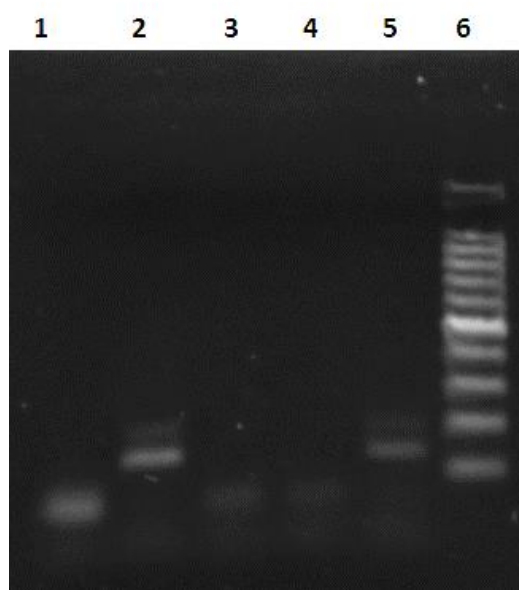


Figura 7. Foto do gel de agarose a 2% com os produtos de PCR do protocolo 03, corado com brometo de etídio. Legenda: **1** – controle negativo. **2** – HHV-1. **3** – HHV-2. **4** – HPV **5** – Pool de amostras (HHV-1 + HHV-2 + HPV) **6** – Peso molecular de 100 pb.

Após a análise dos três protocolos utilizados, o protocolo 02 foi eleito para a padronização da PCR *multiplex*. Para otimizar este protocolo, diversos testes foram realizados com variações na concentração de dNTPs, cloreto de magnésio, *Taq* DNA polimerase, dos iniciadores, e também nas concentrações de DNA para os três vírus (Quadro 8 e 9). Além disso, os iniciadores GP5+ e GP6+ específicos para HPV foram testados, no entanto não obtivemos amplificação do fragmento corresponde ao HPV com o uso destes.

Quadro 8. Testes realizados com diferentes variações no protocolo 02.

	Teste 01	Teste 02	Teste 03	Teste 04	Teste 05	Teste 06
dNTPs (mM)	0,4	0,4	1,0	1,6	1,6	2,0
Cloreto de Magnésio (mM)	1,4	1,4	1,4	1,4	2,0	2,0
Iniciadores (pmol)	0,2	0,1: HHV-1 0,2: HHV-2 e HPV	0,1: HHV-1 0,2: HHV-2 e HPV	0,1: HHV-1 0,2: HHV-2 e HPV	0,1: HHV-1 0,2: HHV-2 e HPV	0,1: HHV-1 0,2: HHV-2 e HPV
<i>Taq</i> DNA polimerase (U)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,1	0,1

Legenda: em vermelho – alterações realizadas de teste para teste.

Quadro 9. Diferentes concentrações de DNA testadas no protocolo 02.

	Teste 01	Teste 02	Teste 03	Teste 04	Teste 05	Teste 06
HHV1						
Concentração Individual (ng)	16.8	2.1	2.1	1.68	16.8	16.8
Concentração no Pool (ng)	1.4	2.1	2.1	0.42	8.4	8.4
HHV2						
Concentração Individual (ng)	28.4	14.2	14.2	14.2	28.4	28.4
Concentração no Pool (ng)	3.55	28.4	28.4	14.2	28.4	28.4
HPV						
Concentração Individual (ng)	672.8	348.4	348.4	32.8	136.8	136.8
Concentração no Pool (ng)	224.0	348.4	348.4	32.8	136.8	136.8

Dos testes realizados, os resultados obtidos no teste 05, otimizado a partir do protocolo 02 foram os mais satisfatórios em relação às concentrações dos reagentes, onde obtivemos a amplificação simultânea de todos os fragmentos esperados tanto individualmente quanto no pool de amostras (Figura 8).

Nas condições de ciclagem, a temperatura utilizada no protocolo 03 proporcionou o melhor resultado. A mudança na temperatura de anelamento de 60°C a 20 segundos para 1 minuto, foi essencial para a amplificação simultânea. A partir destes testes, foi possível a padronização da PCR *multiplex* para o diagnóstico molecular do HHV-1, HHV-2 e HPV. Os quadros 10 e 11 mostram as condições de ciclagem e o protocolo final utilizado, respectivamente.

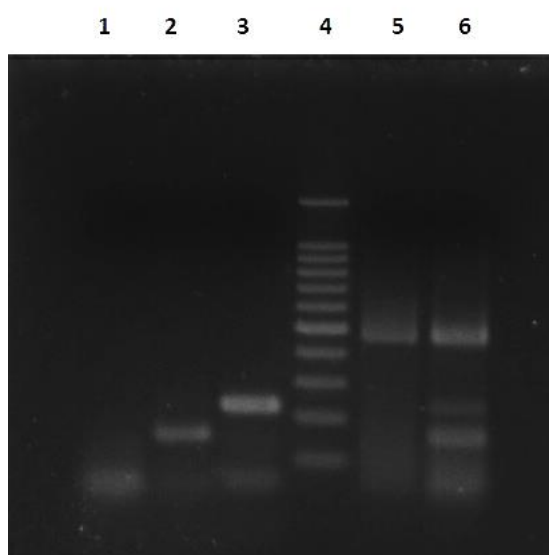


Figura 8. Foto do gel de agarose a 2,5 % com os produtos de PCR do protocolo 02 – teste 06, corado com brometo de etídio. Legenda: **1** – controle negativo. **2** – HHV-1. **3** – HHV-2. **4** – Peso molecular de 100 pb **5** – HPV **6** – Pool de amostras (HHV-1 + HHV-2 + HPV).

Quadro 10. Condições de amplificação dos fragmentos alvo no protocolo padronizado.

Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4	Nº de ciclos Etapa 2-4	Etapa Final
95°C	94°C	60°C	72°C	40 ciclos	72°C
3 min	1 min	1 min	1 min		8 min

Quadro 11. Protocolo padronizado com os reagentes e concentrações da PCR *multiplex* para detecção de *Papillomavírus humano* e *Herpesvírus humano* Tipo 1 e 2

Reagentes	Volume (µL)
Água	10.4
Tampão PCR (1X)	2.5
Mg ₂ Cl ₂ (50 mM)	1.0
Primer H1P32 (10pmol)	0.3
Primer H1M32 (10pmol)	0.3
Primer H2P4 (10pmol)	0.5
Primer H2M40 (10pmol)	0.5
Primer MY09 (10pmol)	0.5
Primer MY11 (10pmol)	0.5
dNTPs (10mM)	4.0
Taq DNA polimerase	0.5
DNA	4.0
Volume Final	25

4.1. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR *MULTIPLEX*

A fim de observar a especificidade do teste, o protocolo padronizado (Quadro 10) foi aplicado para a detecção do genoma de outros vírus de DNA: varicela-zoster, Epstein-Bar, citomegalovírus, poliomavírus e HHV-6. Não foi observada nenhuma amplificação cruzada para os vírus avaliados, o que reforça a especificidade dos iniciadores e do teste.

No que se refere à sensibilidade, o protocolo foi aplicado, em um estudo cego, envolvendo 20 amostras cérvico-uterinas. A concordância entre os resultados do *multiplex* e *singleplex* foi de 85%. Observou-se falha na detecção do HHV-2 e HPV, o que pode ser justificado pela baixa concentração do alvo nas amostras analisadas (inferior a 25ng).

5. DISCUSSÃO

Nos laboratórios de rotina que realizam a detecção do HHV, a cultura viral tem sido o método escolhido como padrão ouro nos últimos 20 anos. No entanto, esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade, devido a limitação da detecção em lesões recorrentes, e naquelas em processo de cicatrização. Além da inviabilidade de escolha desse método em situações de infecções latentes (LEGOFF et al., 2014). Em um estudo como o objetivo de comparar a o teste de PCR com a cultura viral no diagnóstico de herpes genital, dos 103 pacientes participantes no estudo, 63 (61,2%) tiveram um resultado positivo para o HHV através da PCR, enquanto a cultura de vírus foi capaz de detectar o vírus em apenas 30 pacientes (29,1%) (SEN et al., 2008).

Desta forma, as técnicas moleculares vem sendo o método de escolha para a detecção de genomas virais na pesquisa laboratorial. Dentre os métodos, a PCR é amplamente descrita em diversos estudos epidemiológicos e clínicos, especialmente na detecção de diversos tipos de HPV em amostras cérvico-uterino (AUGUSTO et al., 2014; GRADÍSSIMO e BURK, 2017; FARIA et al., 2008; IKENBERG, 2014)

Na a detecção do DNA de HHV-1 e 2 em amostras cervicais, a técnica de PCR também já foi utilizada, com o objetivo de determinar a prevalência do HHV -1 e 2 em associação com o HPV (PÉREZ et al., 2006).

Com o intuito de aumentar a capacidade de diagnóstico desse teste, foi criada a PCR *multiplex*, onde com o uso de mais de um par de iniciadores na reação, é possível a amplificação de mais de uma sequência alvo. Dessa forma é possível a economia do uso e custos de reagentes, tempo de ensaio, além da possibilidade de utilizar uma amostra com baixo volume (CHAMBERLAIN, et al., 1994).

O uso desta técnica para o diagnóstico de HPV, HHV-1 e 2, seria útil nos casos de infecções latentes e assintomáticas, ademais caso diagnosticado mais de um patógeno, o paciente receberia o tratamento adequado para ambos, limitando a progressão para uma possível neoplasia cérvico-uterina, além do excelente custo benefício, sensibilidade e rapidez quando comparada com as técnicas já utilizadas.

Deste modo, este estudo buscou padronizar a metodologia de PCR tipo *multiplex* para a detecção simultânea do HPV, HHV-1 e 2 nesse tipo de amostras. A PCR em sim apresenta a vantagem de ser mais sensível que outros métodos comumente utilizados para o diagnóstico desses patógenos, a *multiplex* traz a praticidade da redução do número de testes para a identificação dos três vírus, o que

diminui custo, tempo, além da possibilidade do uso de amostras com volume reduzido. Para identificação de diferentes patógenos no campo das doenças infecciosas, vários protocolos de PCR *multiplex* têm sido aplicado com êxito (PHAM et al., 2017; TRUNG et al., 2018; ALANIO e BRETAGNE, 2016; SETH, 2017; PARK e RICKE. 2014).

A fim de padronizar o protocolo de PCR *multiplex* desenvolvido neste estudo, foram escolhidos iniciadores anteriormente descritos individualmente em diversos estudos. Os iniciadores MY09/11 baseados na região L1 do HPV são os mais utilizados nos estudos publicados na literatura, considerados como padrão de referência (BALERIOLA et al., 2008; FONTAINE et al., 2007).

Para amplificação do HHV 1 e 2, os iniciadores H1P32/H1M32 e H2M40/H2P4 específicos para os respectivos vírus, foram escolhidos. Estes iniciadores possuem baixa temperatura de anelamento, o que auxilia na otimização das condições de temperatura da reação de *multiplex*. Seu uso já foi relatado em uma PCR *multiplex* para detecção simultânea de varicella zoster vírus (VZV), HHV 1 e 2 (MARKOULATOS et al., 2000).

Seguindo o protocolo estabelecido por Henegariu et al. (1997), o primeiro teste foi realizado com a finalidade de testar a combinação desses iniciadores em nossa reação multiplex, onde no primeiro protocolo realizado todos foram adicionados de forma equimolar ao *mix* de reagentes. A partir da visualização dos produtos amplificados, foi identificado a amplificação preferencial da sequência alvo de HHV-1 em relação às sequências de HHV-2 e HPV que mostraram uma amplificação oscilante ao decorrer dos testes, constatando a necessidade de otimização da concentração do conjunto de iniciadores referente ao HHV-1. Quando utilizado uma concentração menor (0.1 pmol) destes iniciadores em relação a concentração dos iniciadores de HHV-2 e HPV (0.2 pmol), foram obtidos melhores resultados.

No estudo realizado por Henegariu et al. (1997) é descrito uma amplificação irregular com o uso de concentração equimolares dos iniciadores na PCR, como visto neste estudo, o que determina a necessidade de alteração nas proporções dos iniciadores na reação, de acordo com a intensidade visualizada na amplificação de cada fragmento.

Outro estudo, apresenta dois processos responsáveis pela amplificação preferencial de uma sequência alvo em relação a outra, onde uma oscilação inicial nas interações dos reagentes de PCR, poderia resultar numa concentração de DNA

muito baixa, ou as propriedades e sequências flanqueadoras do alvo, poderiam favorecer uma amplificação específica para apenas uma sequência (MARKOULATOS et al., 2002; MULTER et al., 1995).

Além dos iniciadores, para uma PCR *multiplex* eficiente, a otimização de outros componentes da reação também precisa ser realizada (ELNIFRO et al., 2000). Neste estudo, para que o protocolo ideal fosse alcançado, diversas modificações na concentração de cloreto de magnésio, dNTPs, e da *Taq* DNA Polimerase foram realizadas.

A alteração no cloreto de magnésio gera um grande impacto na otimização da PCR, já que este componente é um cofator para o funcionamento da *Taq* DNA polimerase, e também forma complexos com o dNTPs, ou seja um ajuste criterioso deve ser realizado para que a especificidade da reação não seja prejudicada, e o equilíbrio entre esses reagentes seja mantido (LORENZ, 2012).

Em nossos testes foi possível visualizar essa interação entre os reagentes, quando em um ajuste simultâneo nesses componentes, com uma concentração final de dNTP's a 1,6 mM, cloreto de magnésio a 2mM, e *Taq* DNA polimerase a 0,1 unidade, foi possível visualizar o melhor resultado.

Outros estudos relacionados a padronização da PCR *multiplex*, relataram a necessidade de ajustes desses componentes até que fosse encontrado a concentração ideal para amplificação simultânea das sequências desejadas. Markoulatos et al. (2000) realizaram titulações simultaneamente do cloreto de magnésio e dNTP's em concentrações de 1, 1,25, 1,5 e 2 mM e 0,4, 0,8 e 1,2 mM, respectivamente, no desenvolvimento de uma PCR *multiplex* para detecção simultânea de varicella zoster vírus (VZV), HHV 1 e 2 similar ao executado em nosso estudo.

Na PCR *multiplex* para a detecção simultânea de cinco genes de virulência em *Enterococcus faecium*, executado por Vankerckhoven et al. (2004), foi relatado a necessidade de aumento da concentração de cloreto de magnésio para otimizar a intensidade dos padrões de bandas gerados.

Em relação a concentração de dNTPs, Bai et al. (2010) no seu protocolo de PCR *multiplex* para detecção de seis principais genes de virulência em *Escherichia Coli*, visualizou uma amplificação uniforme e forte ao utilizar uma maior concentração de dNTPs que a descrita em protocolos de PCR *singleplex*.

O mesmo foi observado em referência a *Taq* DNA polimerase. Em uma PCR *multiplex* para o gene da distrofina com nove alvos genômicos, a concentração de polimerase *Taq* DNA polimerase precisou ser aumentada quatro a cinco vezes a mais do que o necessário na PCR *singleplex* para o alcance da amplificação ótima de todos os alvos de interesse (ELNIFRO et al., 2000).

Os estudos descritos acima corroboram com os resultados encontrados neste estudo após a devida modificação na concentração final dos reagentes.

Na otimização das condições de ciclagem, as modificações realizadas foram fundamentalmente na temperatura de anelamento (T_a). A temperatura de anelamento inicial escolhida (56°C) foi baseada na temperatura de fusão calculada para cada um dos iniciadores, porém esta não foi efetiva para amplificação simultânea dos três fragmentos. A partir desse resultado, temperaturas mais baixas e mais altas foram testadas, com o objetivo de encontrar a temperatura que tornasse a amplificação mais específica e eficiente.

Zangerberg et al. (1999) descreveu em seu artigo de revisão, que temperaturas de anelamento mais altas podem resultar em amplificação mais específica, mas pode ser observado uma perda de amplificação do alvo mais longo e redução de forma geral no rendimento da PCR. Já em temperaturas de anelamento mais baixas geralmente é observado um aumento geral na amplificação inespecífica, concomitante ao aumento na amplificação alvo específica. Testes seriados que diferem em único grau podem ser realizados a fim de que se encontre a temperatura de anelamento ideal.

Neste estudo, foi observado a amplificação simultânea dos fragmentos alvo em uma temperatura de anelamento à 60°C . Temperaturas de anelamento inferiores resultaram em amplificações não específicas.

Ao analisar diversos experimentos em um estudo de revisão, Chamberlain et al. (1994) supõe que em uma PCR *multiplex*, a temperatura de anelamento deve ser mantida o mais alto possível, e em um menor número de ciclos que permita a fácil detecção dos produtos, o que reforça o resultado encontrado neste estudo.

Bai et al. (2010) constatou esse fato ao testar diferentes temperaturas em seu protocolo de PCR *multiplex*. O autor conclui que a temperatura de anelamento a 65°C foi a ideal pois equilibrou a sensibilidade e especificidade. Esta temperatura estava 5°C acima das temperaturas estimadas de anelamento para os iniciadores do seu

estudo, no entanto as amplificações observadas foram uniformes e específicas, o que demonstra que a temperatura de anelamento estimada para os iniciadores pode ser diferente da temperatura de anelamento ótima em uma reação de PCR real.

As alterações descritas acima realizadas neste trabalho, foram baseadas em diversos estudos que estabelecem um protocolo com soluções práticas para a otimização da PCR *multiplex*, e resolução dos problemas comumente encontrados (HENEGARIU et al., 1997; LORENZ, 2012; ELNIFRO et al., 2000; MARKOULATOS et al., 2002; EDWARDS e GIBBS, 1994). No entanto, mesmo com a otimização dos reagentes e nas condições de temperatura, houve dificuldades com a amplificação simultânea das amostras de DNA utilizadas para a padronização da reação. Como controle positivo para HHV-1 e 2, foi utilizado DNA extraído de cultivo celular, porém o mesmo não foi possível em relação ao HPV, onde foi utilizado DNA extraído de amostras obtidas de um biobanco.

Estas amostras foram selecionadas com a melhor concentração e pureza de DNA ideal os três vírus, todavia as amostras obtidas para este trabalho, possuíam divergências em relação a quantificação do DNA. No momento da amplificação era notável a diferença entre os fragmentos, onde para o HHV-1 e 2 foram observadas bandas uniformes, específicas e intensas, enquanto que para o HPV era observado uma amplificação com intensidade variável, muitas vezes não visível. Essa limitação especificamente da amostra controle obtida do biobanco pode ser explicada devido ao longo prazo de armazenamento da mesma, o que afetaria a qualidade e integridade do DNA.

Em seu artigo de revisão sobre PCR *multiplex*, Edwards e Gibbs (1994) relatam que amostras de DNA degradadas fornecem sinais mais fracos para bandas longas do que para curtos. Outro fator que pode influenciar na perda de eficiência de amplificação, é a presença de inibidores de PCR nas amostras, que pode ser indicada pela amplificação reduzida de uma sequência mesmo que a amostra possua uma concentração abundante, o que possivelmente gerou a amplificação variável do fragmento correspondente ao HPV neste estudo.

No que diz respeito ao armazenamento, Visvikis et al. (1998), em um artigo de revisão discutem a respeito da extração e estabilidade do DNA para estudos epidemiológicos. O autor cita que a recuperação e a preservação de amostras de DNA com uma alta qualidade dependem principalmente da coleta, manipulação e

armazenamento adequados. Mesmo que os ácidos nucleicos aparentemente retenham características reconhecíveis durante o armazenamento a longo prazo, pode ocorrer uma degradação constante do DNA ao longo do tempo.

Especificamente em relação à um biobanco de citologia cérvico-uterina, Arbyn et al (2011) relata que o armazenamento a longo prazo de DNA/RNA extraído de amostras cervicais preparadas através de citologia baseada em líquido ainda está sob investigação. É estabelecido que fatores como o método de fixação utilizado e o procedimento de extração podem afetar a qualidade e a quantidade de ácido nucléico extraído.

Mediante esta dificuldade, foi realizado a amplificação individual de diversas amostras de DNA proveniente do biobanco, com objetivo de utilizar como controle positivo para o HPV aquelas que apresentassem uma amplificação uniforme e intensa, para que fosse possível obter um bom rendimento da mesma na PCR multiplex.

Além disso de acordo com a amplificação de cada fragmento individualmente ao longo do teste, foi identificado a necessidade de uma concentração de DNA menor ou maior para cada vírus. Os testes iniciaram com uma alta concentração de DNA e a quantidade foi diminuída ao longo das reações. A amplificação simultânea foi alcançada com uma concentração mínima de 16.8 ng para o HHV-1, de 28.4 ng para o HHV-2 e de 136.8 ng para o HPV. Este resultado condiz com o trabalho de Zangenberg et al. (1999), onde o autor afirma que em experimentos iniciais de otimização de PCR *multiplex*, o ideal é utilizar de 10-100 ng de DNA. Quantidades maiores que esse valor podem ser testadas caso a amostra esteja muito degradada. Adicionar excessivamente pode levar a um aumento da amplificação dependente de um molde não específico, ou gerar uma amplificação fraca ou ausente, principalmente com a presença de um inibidor da DNA polimerase na amostra extraída.

Com o uso das amostras ideais selecionadas individualmente, foi possível observar a amplificação simultânea das sequências correspondentes ao três vírus de nosso estudo, de forma evidente, homogênea, e com a devida distinção entre os fragmentos alvo.

A PCR *multiplex* padronizada neste estudo, é voltada para o diagnóstico das infecções genitais causadas pelo HPV, HHV-1 e 2 em amostras cérvico-uterinas primariamente recém coletadas. Desta forma, acredita-se que com uma adequada extração de DNA, que forneça uma amostra íntegra e de qualidade, este protocolo

será capaz de detectar de forma eficiente todos os três vírus. Sendo assim, ainda se faz necessário o prosseguimento deste estudo para que a PCR seja aplicada e validada em estudo epidemiológico em uma amostragem cérvico-uterinas recém-coletadas.

6. CONCLUSÃO

A partir da otimização dos componentes da reação, e o uso de amostras de DNA em concentrações adequadas, foi desenvolvida uma PCR *multiplex* capaz de detectar HPV, HHV-1 e 2 em baixas quantidades de DNA apresentando-se como uma técnica sensível e específica, capaz de classificar e distinguir cada vírus separadamente em uma amplificação simultânea. É necessário a aplicação deste método em amostras cérvico-uterinas recém coletadas, para que assim seja realizada a validação da técnica.

7. REFERÊNCIAS

- AGYEMANG-YEBOAH, F.; DEBRAH, O.; DONKOH, E. T.; ASMAH, H. R.; SEINI, M. M. Co-Infection Prevalence of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 with Human Papillomavirus and Associated Risk Factors among Asymptomatic Women in Ghana. **International Journal of Infectious Diseases and Therapy**, v. 3, n. 3, p. 45-51, 2018.
- ALANIO, A.; BRETAGNE, S. Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus*—not so simple!: Table 1.. **Medical Mycology**, v. 55, n. 1, p.56-62, 23 set. 2016.
- AMORIM, A. T.; MARQUES, L. M.; CAMPOS, G. B.; LOBÃO, T. N.; DE SOUZA LINO, V.; CINTRA, R. C.; ANDREOLI, M. A.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; JUNIOR A. C. R. B.; LÓPEZ, R. V. M.; DOS SANTOS, D. B.; DE SOUZA, G. M.; ROMANO, C. C.; TIMENETSKY, J. Co-infection of sexually transmitted pathogens and Human Papillomavirus in cervical samples of women of Brazil. **Bmc Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p.1-12, dez. 2017.
- ARBYN, M.; ANDERSSON, K.; BERGERON, C.; BOGERS J. P.; VON KNEBEL-DOEBERTITZ, M.; DILLNER, J. Cervical Cytology Biobanks as a Resource for Molecular Epidemiology. **Methods In Molecular Biology**, p.279-298, 23 set. 2010.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features*. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p.107-121, 26 jul. 2007.
- AUGUSTO, E. F.; SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, SANTOS, L. H. Human papillomavirus detection in cervical scrapes from women attended in the Family Health Program. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p.100-107, jan. 2014.
- AZAMBUJA T.W.F.; BERCINI, F.; FURLANETTO, T.W. Herpes simples: a revisão da literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Porto Alegre, v. 4, n.2, p. 43-46 2004.
- BAI, J; SHI, X.; NAGARAJA, T. G. A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 1, p.85-89, jul. 2010.
- BALERIOLA, C.; MILLAR, D.; MELKI, J.; COULSTON, N.; ALTMAN, P.; RISMANTO, N.; RAWLINSON, W. Comparison of a novel HPV test with the HybridCapture II (hcII) and a reference PCR method shows high specificity and positive predictivevalue for

- 13 high-risk human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 1, p.22-26, maio 2008.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. **Pcr Protocols**, p.3-6, 2003.
- BEAUMAN, J. G. Genital herpes: a review. **American Family Physician**. v. 72, n. 8, p. 1527-1534, 2005.
- BELDA J.; SHIRATSU, W.; PINTO, R. V. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 2, n. 84, p.151-59. 2009.
- BERNARD, C.; MOUGIN, C.; BETTINGER, D.; DIDIER, J. M.; LAB, M. Detection of human papillomavirus by in situ polymerase chain reaction in paraffin-embedded cervical biopsies. **Molecular And Cellular Probes**, v. 8, n. 5, p.337-343, out. 1994.
- BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J. L. M.; SHAH, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**. v. 55, p. 244-265, 2002.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p.73-81, fev. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. - Rio de Janeiro: INCA. p, 65., 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 120 p., 2015
- BRIANTI, P.; FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiologica**, v. 2, n. 40, p.80-85, abr. 2017
- BRINGHENTI, M. E.; DOZZA, T. G.; DOZZA, T. G. MARTINS, T. R.; BAZZO, M. L. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Trasmisíveis**, v. 22, n. 3, p.135-140, 2010.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26. ed. **AMGH Editora**, 2014.

- BURCHELL, N. A., WINER, R. L., SANJOSÉ, S., FRANCO, E. L. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, p.52-61, ago. 2006.
- BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.1-17, 2003.
- CARVALHO, M. O., ALMEIDA, R. W., LEITE, F. M., FELLOWS, I. B., TEIXEIRA, M. H., OLIVEIRA, L. H.; CAVALCANTI, S. M. B. Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p.121-125, abr. 2003.
- CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p.191-199, nov. 2002.
- CHAMBERLAIN, J. S.; CHAMBERLAIN, J. R. Optimization of Multiplex PCRs. **The Polymerase Chain Reaction**, p.38-46, 1994.
- CHERPES, T. L.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. Cunnilingus and vaginal intercourse are risk factors for herpes simplex virus type 1 acquisition in women. **Sexually transmitted diseases**, v. 32, p. 84 – 9, 1 2005.
- CLEATOR, G. M. & KLAPPER, P. E. Herpes Simplex in: Principles and Practice of Clinical Virology, 5th ed. **John Wiley & Sons Ltd.**: 27-50, 2004.
- CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 726 – 734, 08 2010.
- COSTELLO, M.; SABATINI, L., YUNGBLUTH, P. Herpes Simplex Virus Infections and Current Methods for Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 28, n. 24, p. 185-192, 2006.
- COYLE, P. V.; DESAI, A.; WYATT, D.; MCCAUGHEY, C.; O'NEILL, H. J. A comparison of virus isolation, indirect immunofluorescence and nested multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of primary and recurrent herpes simplex type 1 and type 2 infections. **Journal of Virological Methods**, v. 83, n. 1-2, p.75-82, dez. 1999.
- DAHLSTROM, L. A.; ANDERSSON, K.; LUOSTARINEN, T.; YOUNGMAN, L.; JELLUM E.; KOSKELA P.; GISLEFOSS R. E.; HALLMANS, G.; PAAVONEN, J.; SAPP, M.; SCHILLER, J. T.; HAKULINEN, T.; THORESEN, S.; HAKAMA, M. Prospective Seroepidemiologic Study of Human Papillomavirus and Other Risk

Factors in Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. 12, p.2541-2550, 12 out. 2011.

DAVISON, EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; MCGEOCH, D. J.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p.171-177, 9 dez. 2008.

DE RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M. M.; VAN DE BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongate dat their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 4, p.1057-1062, 1 abr. 1995.

DE VILLIERS, E. M., FAUQUET, C., BROKER, T. R., BERNARD, H. U, HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**. v. 324, n. 1, p.17-27, jun. 2004.

DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO, F. A.; SYRJANEN, K. J., Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 7, p.425-433, jul. 2005.

DO CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, 2007

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p.7-15, mar. 2005.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO I. G.; STOLER M.; BROKER T. R.; STANLEY M. A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p.55-70, nov. 2012.

DRUCE, J.; CATTON, M.; CHIBO, D.; MINERDS, K.; TYSEN, D.; KOSTECKI, R.; MASKILL, B.; LEONG-SHAW, W.; GERRARD, M.; BIRCH C. Utility of a Multiplex PCR Assay for Detecting Herpesvirus DNA in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p.1728-1732, 1 maio 2002.

DUARTE, D.; VIEIRA, R.; BRITO, E.; PINHEIRO M. D. C. N.; MONTEIRO J. D. S. V.; VALENTE M. D. R.; ISHIKAWA, E. A. Y.; FUZII, H. T.; SOUSA, M.S. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening among Riverside Women of the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / Rbgo Gynecology And Obstetrics**, v. 39, n. 07, p.350-357, 28 jun. 2017.

DURUKAN, D; FAIRLEY, C K; BRADSHAW, C S. READ, T. R. H.; DRUCE, J.; CATTON, M.; CALY, L.; CHOW, E. P. F. Increasing proportion of herpes simplex virus

type 1 among women and men diagnosed with first-episode anogenital herpes: a retrospective observational study over 14 years in Melbourne, Australia. **Sexually Transmitted Infections**, p.1-7, 15 dez. 2018.

EDWARDS, M. C.; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: Advantages, Development, and Application. **PCR Methods and Applications**, 1994.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E.; Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p.559-570, 1 out. 2000.

EL-ZEIN, M.; RICHARDSON, L.; FRANCO, E. L.; Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: Cytology, molecular testing, both or none. **Journal of Clinical Virology**, v. 76, p.62-68, mar. 2016.

ESPY, M. J.; UHL, J. R.; MITCHELL, S.; THORVILSON J. N.; SVIEN K. A.; WOLD A. D.; SMITH T. F. Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infections in the Clinical Laboratory by LightCycler PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 38, p.795-799, Fev 2000.

EVANS, C. M.; KUDESIA, G.; MCKENDRICK, M. Management of herpesvirus infections. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 2, p. 119-28, 2013.

FARIA, I. M.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F.; FARIA, F. M.; CARVALHO, N. O.; ARAÚJO, A. C. L.; OLIVEIRA, H. C. Acuidade da citologia oncológica para o diagnóstico da infecção pelo HPV no colo uterino de mulheres portadoras do HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 9, p.437-444, set. 2008.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex labialis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 32, n. 6, p.625-630, nov. 2007.

FATHI, R.; TSOUKAS, M. M. Genital warts and other HPV infections: Established and novel therapies. **Clinics In Dermatology**, v. 32, n. 2, p.299-306, mar. 2014.

FEDRIZZI, E.N., SCHLUP, C.G., MENEZES, M.E., OCAMPOS, M. Infecção pelo papillomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **Jornal Brasileiro De Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.20, n. 2, p. 73-79, 2008.

FEHRMANN, F.; KLUMPP D. J.; LAIMINS L, A. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p.2819-2831, 1 mar. 2003.

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R. V.; CARVALHO, M. G. F.; AZEVEDO, P. R. M.; VILLA, L. L. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil.

International Journal of Gynecology & Obstetrics, v. 105, n. 1, p.21-24, 15 jan. 2009.

FINAN, R. R.; MUSHARRAFIEH, U.; ALMAWI, W.Y. Detection of Chlamydia trachomatis and herpes simplex virus type 1 or 2 in cervical samples in human papilloma virus (HPV)-positive and HPV-negative women. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 12, n. 9, p.927-930, set. 2006.

FONTAINE, V.; MASCAUX, C.; WEYN, C.; BERNIS, A.; CELIO, N.; LEFEVRE, P.; KAUFMAN, L.; GARBAR, C. Evaluation of Combined General Primer-Mediated PCR Sequencing and Type-Specific PCR Strategies for Determination of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cell Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p.928-934, 17 jan. 2007.

FORMAN, D.; MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI, L.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. **Vaccine**, v. 30, p.12-23, nov. 2012.

FRAZER, I. H.; COX, J. T.; MAYEAUX, E. J. Jr.; FRANCO, E. L.; MOSCICKI, A. B.; PALEFSKY, J. M.; FERRIS, D. G.; FERENCZY, A. S.; VILLA, L. L. Advances in Prevention of Cervical Cancer and Other Human Papillomavirus-Related Diseases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. p.65-81, fev. 2006.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M. Genital herpes. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 7, p.1098-1110, out. 2014.

GAVILLON, N.; VERVAET, H.; DERNIAUX, E.; TERROSI, P.; GRAESSLIN, O.; QUEREUX, C. Papillomavirus humain (HPV): comment ai-je attrapé ça? **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 38, n. 3, p.199-204, mar. 2010.

GELLER, M.; SUCHMACHER NETO, M.; RIBEIRO, M.; Oliveira, L.; NALIATO, E.; ABREU, C.; SCHECHTMAN, R. C. Herpes simples: Atualização Clínica, Epidemiológica E Terapêutica. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 24, n. 4, p.260-266, 2012.

GIRIANELLI, V. R.; THULER, L. C. S.; SZKLO, M.; DONATO, A.; ZARDO, L. M. G.; LOZANA, J. A.; NETO, O. F. A.; CARVALHO, A. C. L.; MATOS, J. H.; FIGUEIREDO, V. Comparação do desempenho do teste de captura híbrida II para HPV, citologia em meio líquido e citologia convencional na detecção precoce do câncer do colo do útero

e de suas lesões precursoras no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 225-226, 2004.

GNANN, J. W.; WHITLEY, R. J. Genital Herpes. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 7, p. 666-674, 18 ago. 2016.

GRADÍSSIMO, A.; BURK, R. D. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 4, p.379-391, 20 fev. 2017.

GRAHAM, D. A.; HERRINGTON, C. S. HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. **Molecular Pathology**, v. 53, n. 4, p.201-206, 1 ago. 2000.

GROVES, M. J. Genital Herpes: A Review. **American Family Physician**. v. 93, n. 11. p, 928-934. 1 Jun 2016.

GUIDRY, J. T.; SCOTT, R. S. The interaction between human papillomavirus and other viruses. **Virus Research**, v. 231, p.139-147, mar. 2017.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet (London, England)**, v. 370, p. 2127 – 37, 12 2007.

HADDOW L. J.; DAVE B.; MINDEL A.; MCPHIE K. A.; CHUNG C.; MARKS C.; DWYER D. E. Increase in rates of herpes simplex vírus type 1 as a cause of anogenital herpes in western Sydney, Australia, between 1979 and 2003. **Sexually Transmitted Infections**, v. 82, n. 3, p. 255-59, 2006.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p.504-511, set. 1997.

HILDESHEIM, A.; MANN, V.; BRINTON, L. A.; SZKLO, M.; REEVES, W. C.; RAWLS, W. E. Herpes simplex virus type 2: A possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development of invasive cervicalcancer. **International Journal of Cancer**, v. 49, n. 3, p.335-340, 30 set. 1991.

HODGES, A. L.; HOLLAND, A. C. Common Sexually Transmitted Infections in Women. **The Nursing clinics of North America**, v. 53, p. 189 – 202, 5 2018.

ICO- Institut Català d'Oncologia. HPV Information Centre. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. Disponível em: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>. Acesso em: 22 de mar. 2019.

ICTV, 2018.; ICTV 9th Report (2011) **Herpesviridae**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae> Acesso em: 23/03/2019.

ICTV, 2011.; ICTV 9th Report (2011) **Papillomaviridae**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae> Acesso em: 23/03/2019

IKENBERG, H. Laboratory Diagnosis of Human Papillomavirus Infection. **Human Papillomavirus**, p.166-174, 2014.

IRIE, M. M. T.; SUZUKI, L. E.; YOSHIDA, C. S.; LOPES, D. C.; CONSOLARO, M. EL. Avaliação dos critérios morfológicos clássicos e não clássicos de HPV no diagnóstico colpocitológico. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 5, n. 3, p. 259-266, 2001.

JACOBSON, J. G.; YANG, K.; BAINES, J. D.; HOMA, F. L. Linker Insertion Mutations in the Herpes Simplex Virus Type 1 UL28 Gene: Effects on UL28 Interaction with UL15 and UL33 and Identification of a Second-Site Mutation in the UL15 Gene That Suppresses a Lethal UL28 Mutation. **Journal of Virology**, v. 80, n. 24, p.12312-12323, 11 out. 2006.

JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R.; PIVA, S.; CONSOLARO, M. E. L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citológico de papillomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, v. 39, n. 1, p. 81-89, 2003.

JUNG, W. W.; CHUN, T.; SUL, D.; HWANG, K. W.; KANG, H.S.; LEE, D.J.; HAN, I.K. Strategies against human papillomavirus infections and cervical cancer. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 255-266, 2004.

KANESHIMA, E. N.; SUZUKI, L. E.; IRIE, M. M. T.; YOSHIDA, C. S.; SILVA, S. F. M. S.; CONSOLARO, M. E. L. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 35, p. 29-33, 2003.

KIM, H. J.; TONG, Y.; TANG, W.; QUIMSON, L.; COPE, V. A.; PAN, X.; MOTRE, A, KONG, R.; HONG, J.; KOHN, D. MILLER, N.S., POULTER, M. D.; KONG, H.; TANG, Y. W.; YEN-LIEBERMAN, B. A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification

test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 1, p.26-30, jan. 2011.

KOLOKOTRONIS, A.; DOUMAS, S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, p. 202 – 11, 2 2006.

LEGOFF, J.; PÉRE, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virology journal**, v. 11, p. 83 –, 6 2014.

LEHTINEN, M. Herpes Simplex Virus and Risk of Cervical Cancer: A Longitudinal, Nested Case-Control Study in the Nordic Countries. **American Journal Of Epidemiology**, v. 156, n. 8, p.687-692, 1 out. 2002.

LETO, M. P.; JÚNIOR, G. F. S.; PORRO, A. M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p.306-317, abr. 2011.

LI, S.; WEN, X. Seropositivity to herpes simplex virus type 2, but not type 1 is associated with cervical cancer: NHANES (1999–2014). **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p.1-9, 7 nov. 2017.

LOOKER K. J.; MAGARET A. S.; MAY M.T.; TURNER K. M.; VICKERMAN P.; GOTTLIEB S. L.; NEWMAN L. M. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLoSOne**. v. 28, n. 10, p. 10, 2015. (a).

LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; TURNER, K. M. E. VICKERMAN P.; GOTTLIEB S. L.; NEWMAN L. M. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-23, 21 jan. 2015. (b).

LORENZ, T, C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p.1-15, 22 maio 2012.

LOWHAGEN, G. B.; TUNBACK, P.; BERGSTROM, T. Proportion of herpes simplex virus (HSV) type 1 and type 2 among genital and extragenital HSV isolates. **Acta Dermato-Venereologica**. v. 82, p. 118–20, 2002.

LUPI, O.; LAMY, F.; SEMENOVITCH, I. Infecção por Herpesvírus. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 2010.

- MANSI, J. A. Vaccination against human papillomavirus. **Canadian Medical Association of Journal**, v. 177, n. 12, p. 1524, 2007.
- MARANA, H. R. C.; DUARTE, G.; QUINTANA, S. M. Fatores de risco para recidiva após tratamento de lesões provocadas pelo HPV no trato genital feminino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 21, n. 4, p. 201-205, 1999.
- MARIANI, L.; IGIDBASHIAN, S.; SANDRI, M. T.; VICI, P.; LANDONI, F. The clinical implementation of primary HPV screening. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 136, n. 3, p.266-271, 3 jan. 2017.
- MARKOULATOS, P.; GEORGOPOULOU, A.; KOTSOVASSILIS, C.; KARABOGIA-KARAPHILLIDES, P.; SPYROU, N. Detection and typing of HSV-1, HSV-2, and VZV by a multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 14, n. 5, p.214-219, 2000.
- MARKOULATOS, P.; GEORGOPOULOU, A.; SIAFAKAS, N.; PLAKOKEFALOS, E.; TZANAKAKI, G.; KOUREA-KREMASTINO, J. Laboratory Diagnosis of Common Herpesvirus Infections of the Central Nervous System by a Multiplex PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p.4426-4432, 1 dez. 2001.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p.47-51, 2002.
- MEYERS, CRAIG; ANDREANSKY, SAMITA S; COURTNEY, RICHARD J. Replication and interaction of herpes simplex virus and human papillomavirus in differentiating host epithelial tissue. **Virology**, v. 315, n. 1, p.43-55, out. 2003.
- MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, n. 1, p.29-37, jan. 2003.
- MULTER, G. L.; BOYNTON, K. A. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotiderepeat marker used in clonality studies. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 8, p.1411-1418, 1995.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJIDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. International agency for research on cancer multicenter cervical cancer study group. Epidemiologic classification of human papillomavirus type associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p.518-527, 2003.

NORONHA, V.; CRUZ, M. E.; NAUM-PINHO, C.; MELLO, W.; NORONHA, R.; SILVEIRA, I.; MENDES, S.; VILLA, L. Papilomavirus humano em mulheres submetidas à colpocitologia oncológica. **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 2, p. 130-136, 2006.

PARK, S. H.; RICKE, S.C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of Salmonellagenus, Salmonella subspecies I, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1, p.152-160, 21 nov. 2014.

PATEL, R.; ALDERSON, S.; GERETTI, A.; NILSEN, A.; FOLEY, E.; LAUTENSCHLAGER, S.; GREEN, J.; VAN DER MEIJDEN, W.; GOMBERG, M.; MOI, H. European guideline for the management of genital herpes. **International Journal of STD AIDS**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2011.

PEÑA, K. C.; ADELSON, M. E.; MORDECHAI, E.; BLAHO, J. A. Genital Herpes simplex vírus type 1 in women: detection in cérvico vaginal specimens from gynecological practices in the United States. **Journal of Clinical Microbiology and Cancer**, v. 17, p; 651-660, 2007.

PENELLO, A. M.; CAMPOS, B. C.; SIMÃO, M. S.; GONÇALVES, M. A.; SOUZA, P. M. T.; SALLES, R. S.; PELLEGRINI, E. Genital Herpes. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n.2, p.64-72, 2010.

PEREIRA, V. S.; MOIZEIS, R. N.; FERNANDES, T. A.; ARAÚJO, J. M.; MEISSNER, R. V.; FERNANDES, J. V. Herpes simplex virus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, v. 161, n. 2, p.190-193, abr. 2012.

PÉREZ, L. O.; BARBISAN, G.; ABBA, M. C.; LAGUENS, R. M.; DULOUT, F. N.; GOLIJOW, C. D. Herpes Simplex Virus and Human Papillomavirus Infection in Cervical Disease in Argentine Women. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 25, n. 1, p.42-47, jan. 2006.

PHAM, N.; USHIJIMA, H.; THONGPRACHUM, A.; TRINH, Q. D.; KHAMRIN, P.; ARAKAWA, C.; ISHII, W.; OKITSU, S.; KOMINE-AIZAWA, S.; HAYAKAWA, S. Multiplex PCR for the Detection of 10 Viruses Causing Encephalitis / Encephalopathy and its Application to Clinical Samples Collected from Japanese Children with Suspected Viral. **Clinical Laboratory**, v. 63, n. 01/2017, p.91-100, 2017

PINHEIRO, M. M.; QUEIROZ, L. L. C.; QUEIROZ, R. C. C. S.; LIMA, J. M. M. P. HPV E O Desenvolvimento De Neoplasias: Uma Revisão Integrativa De Literatura. **Revista de Ciências da Saúde**, v.15, n. 1, p. 19-27, jan-jun, 2013.

PINTO, A. P. Co-fatores do HPV na Oncogênese Cervical. **Revista da associação de medicina brasileira**. v.48, n.1, p. 29-38, 2001.

POERSCHKE DE QUEVEDO, J.; INÁCIO, M.; MORO, W. A.; INVERNIZZI N. A política de vacinação contra o HPV no Brasil: a comunicação pública oficial e midiática face à emergência de controvérsias. **Revista Tecnologia e Sociedade**. v. 12, n. 24, p. 1-26, jan-abr. 2016.

PRESCOTT, L. M. Human Diseases Caused by Viruses in: Microbiology, 5thed. **The McGraw-Hill Companies**: p. 870-898, 2002.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. O papilomavírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 151-157, 2007.

RÁCZ, M.L. Papilomavírus. In: Microbiologia. L.R. Trabulsi & F. Althertuhm (eds). **Atheneu** – São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, p. 627- 629, 2004.

RAMASWAMY, M.; MCDONALD, C.; SMITH, M.; THOMAS, D.; MAXWELL, S.; TENANT-FLOWERS, M.; GERETTI, A. M. Diagnosis of genital herpes by real time PCR in routine clinical practice. **Sexually Transmitted Infections**, v. 80, n. 5, p.406-410, 1 out. 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rang & Dale Farmacologia. 8. ed.: **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2016.

RATNAM, S.; SEVERINI, A.; ZAHARIADIS, G.; PETRIC, M.; ROMANOWSKI, B. The diagnosis of genital herpes - beyond culture: An evidence-based guide for the utilization of polymerase chain reaction and herpes simplex virus type-specific serology. **Canadian Journal of Infectious Diseases And Medical Microbiology**, v. 4, n. 18, p.233-240, jul. 2007.

RIBES, J. A.; HAYES, M.; SMITH, A.; WINTERS, J. L.; BAKER D. J. Comparative Performance of Herpes Simplex Virus Type 2-Specific Serologic Assays from Meridian Diagnostics and MRL Diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p.3740-3742, 1 out. 2001.

- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology.5**. United States: v.1, .cap 67, p.2502 – 2601, 2007.
- RUSSOMANO, F.; REIS, A.; CAMARGO, M. J.; DUTRA, M. V. P.; FONSECA, S. C.; ANDERSON, J. Efficacy in treatment of subclinical cervical HPV infection without intraepithelial neoplasia: systematic review. **São Paulo Medical Journal**. v. 118, n. 4, p.109-115, 6 jul. 2000.
- RYAN, M. **The Herpes Virus and Hashimoto's**. 2016. Disponível em: <<https://hashimotoshealing.com/the-herpes-virus-and-hashimotos/>> Acesso em: 23 mar. 2019.
- SANCLEMENTE, G; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, v. 16, n. 3, p.231-240, maio 2002.
- SANJOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; NUÑOZ, N. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. The **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 7, p.453-459, jul. 2007.
- SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à Virologia Humana 2. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008
- SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**. v. 15, p. 727-746, 2005.
- SCOULAR, A. Using the evidence base on genital herpes: optimising the use of diagnostic tests and information provision. **Sexually Transmitted Infections**, v. 78, n. 3, p.160-165, 1 jun. 2002.
- SEN, P.; SUN, Y. J.; TAN, H. H.; TAN, S. H.; CHAN, R. Comparison of nested-polymerase chain reaction and virus culture for the diagnosis of genital herpes simplex virus infection. **Singapore Medical Journal**. v. 49, n. 6, p. 466. 2008.
- SERMAN, F. Cancer Cervico Uterino: Epidemiologia, Historia natural y rol del Vírus Papiloma Humano. Perspectivas em Prevencion y Tratamiento. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología**.v.67, p. 318-323, 2002.
- SETH, R. Rapid and Accurate Diagnosis of Acute Pyogenic Meningitis Due to Streptococcus Pneumoniae, Haemophilus Influenzae Type b and Neisseria Meningitis

Using A Multiplex PCR Assay. **Journal of Clinical And Diagnostic Research**, v. 11, n. 9, p.01-04, 2017.

SHANEHSAZZADEH, M.; SHARIFIRAD, J.; BEHBAHANI, M.; POURAZAR, A. Analysis of Human Papillomavirus and Herpes Simplex Virus Genus -2 from Patients with Cervical Cancer in Isfahan, Iran. **Materia Socio Medica**, v. 26, n. 4, p.234-236, 2014.

SILVA, E. J.; CORRÊA, M. M. J.; SANTOS, M. A. T.; FLORES, L. S. Considerações Relacionadas Ao Diagnóstico E Tratamento Do Papilomavírus Humano (HPV) Em Cavidade Oral. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 2, n. 28, p.117-125, 2016.

SMITH, J. S. Herpes Simplex Virus-2 as a Human Papillomavirus Cofactor in the Etiology of Invasive Cervical Cancer. **Cancer Spectrum Knowledge Environment**, v. 94, n. 21, p.1604-1613, 6 nov. 2002.

SMITH, J.S.; LINDSAY, S.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G.M. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**. v.121, p. 621-32, 2007.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-60, 2005.

SOUZA, R. P.; DE ABREU, A. L, FERREIRA, É. C.; ROCHA-BRISCHILIARI, S. C.; DE B CARVALHO, M. D.; PELLOSO, S. M.; BONINI, M. G.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M, E. Simultaneous Detection of Seven Sexually Transmitted Agents in Human Immunodeficiency Virus–Infected Brazilian Women by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 89, n. 6, p.1199-1202, 4 dez. 2013.

SUZICH, J. B.; CLIFFE, A. R. Strength in diversity: Understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. **Virology**, v. 522, p.81-91, set. 2018.

Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). **Papillomaviridae**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/5?outline=all_by_species> Acesso em: 23 mar. 2019.

SZOSTEK, S.; KLIMEK, M.; ZAWILINSKA, B.; RYS, J.; KOPE, J.; DASZKIEWIC, E. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochimica Polonica**. v.53, n. 3, p. 603-607, 2006.

TORRE, L. A.; ISLAMI, F. SIEGEL, R.L.; WARD, E.M.; JEMA, A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 4, p.444-457, 21 fev. 2017.

TRUNG, N. T.; VAN TONG, H.; LIEN, T. T.; VAN SON, T.; THANH HUYEN, T. T.; QUYEN, D. T.; HOAN, P. Q.; MEYER, C. G.; SONG, L. H. Clinical utility of an optimised multiplex real-time PCR assay for the identification of pathogens causing epsis in Vietnamese patients. **International Journal Of InfectiousDiseases**, v. 67, p.122-128, fev. 2018.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H. U.; CHAN, P. K. S.; DESALLE, R.; DILLNER, J.; FORSLUND, O.; HAGA, T.; MCBRIDE, A. A.; VILLA, L. L. BURK, R. D. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 8, p.989-990, 1 ago. 2018.

VANKERCKHOVEN, V.; VAN AUTGAERDEN, T.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p.4473-4479, 1 out. 2004.

VARELLA, R. B. PIRES, I. L.; SARAIVA, C. A.; GUIMARÃES, A. C. C.; GUIMARÃES, M. A. M. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 257 – 262, 08 2005.

VISVIKIS, S.; SCHLENCK, A.; MAURICE, M. DNA Extraction and Stability for Epidemiological Studies. **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine**, v. 36, n. 8, p.551-555, 1 jan. 1998.

WALD, A.; HUANG, M. L.; CARRELL, D.; SELKE, S.; COREY, L. Polymerase Chain Reaction for Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA on Mucosal Surfaces: Comparison with HSV Isolation in Cell Culture. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 188, n. 9, p.1345-1351, nov. 2003.

WALD, A.; ZEH, J.; SELKE, S.; WARREN T.; RYNCARZ, A. J.; ASHLEY, R.; KRIEGER, J. N.; COREY, L. Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. **The New England Journal of Medicine**. v. 12, n. 23, p. 844 – 850, Mar 2000.

WATSON, G.; XU, D.; REED, A.; BABRA, B.; PUTMAN, T; WICK, E.; WECHSLER, S. L.; ROHRMANN, G. F.; JIN, L. Sequence and comparative analysis of the genome of HSV-1 strain McKrae. **Virology**, v. 433, n. 2, p.528-537, nov. 2012.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet (London, England)**, v. 357, n. 1513, p – 8, 5 2001.

WHO (World Health Organization). **Herpes Simplex Virus**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/>> Acesso em: 23.Mar. 2019.

WHO (World Health Organization). **Sexually Transmitted Infections (STIs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))> Acesso em: 23.Mar.2019.

ZANGENBERG, G.; SAIKI, R.K.; REYNOLDS, R. Multiplex PCR. **PCR Applications**, p.73-94, 1999.

ZHAO, Y.; CAO, X.; ZHENG, Y.;TANG, J.;CAI, W.;WANG, H.;GAO, Y, WANG, Y. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 12, p.1920-1927, 10 out. 2012.