

Infección cervical por el virus del papiloma humano: diagnóstico por citología y por captura de híbridos del ADN viral

Drs. José Andrés Mendoza, Maritza Muñoz, Silvana Vielma, María Eugenia Noguera, Mercedes López, Morelba Toro

Facultad de Medicina y Farmacia. Universidad de Los Andes, Mérida

RESUMEN

Objetivo: Comparar la citología con el método de captura de híbridos del ADN viral para diagnóstico del virus del papiloma humano.

Método: Se estudiaron 101 mujeres que acudieron a la consulta de ginecología en la Sociedad Anticancerosa de Mérida, Estado Mérida.

Ambiente: Facultad de Medicina y Farmacia de la Universidad de Los Andes, Mérida.

Resultados: Se obtuvieron muestras cervicales para la realización de ambos métodos. Diez resultaron positivas para el virus por el método de captura. La citología detectó "lesión intraepitelial escamosa de bajo grado" en dos de los casos positivos por el método de captura. Los casos restantes fueron descritos como "otras alteraciones". Las citologías "normales" resultaron negativas por el mismo método.

Conclusiones: La citología de células cervicales es un método poco sensible para establecer diagnóstico de infección por virus del papiloma humano. Se recomienda el método de captura de híbridos del ADN viral en mujeres con citología anormal y confirmación de casos dudosos.

Palabras clave: Virus del papiloma humano. Infección cervical. Captura de híbridos. Citología cervical.

SUMMARY

Objective: To compare the cytology with viral DNA hybrid capture system for diagnosis of human papilloma virus.

Method: One hundred and one women that assisted to the out patient gynecological office of the Anticancer Society of Merida, Merida State were studied.

Setting: Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Los Andes, Merida.

Results: Cervical samples were obtained for performing both methods. Ten were positives for the capture method. Cytology detected "low degree squamous intraepithelial lesion" in two of the positive cases for the capture method. The remaining cases were described as "other alterations". "Normal" cytologies were negatives for the same method.

Conclusions: The cytology of cervical cells is a low sensitive method for diagnosis of human papilloma virus infection. We recommend the viral DNA hybrid capture system in women with abnormal cytologies and confirmation of questionable cases.

Key words: Human papilloma virus. Cervical infection. Hybrid capture assay.

INTRODUCCIÓN

La infección del cuello uterino por virus del papiloma humano (VPH) se adquiere por contacto sexual y puede generar lesiones clínicas, subclínicas o latentes (1). Para establecer el diagnóstico, se han empleado tradicionalmente el examen clínico, la

colposcopia y los estudios citológicos e histopatológicos (2). Sin embargo, hoy en día se utilizan cada vez más, métodos basados en la manipulación de ácidos nucleicos para detectar y tipificar VPH con excelente sensibilidad y especificidad (1,3-7).

Se afirma que la infección genital por algunos subtipos de VPH causa la mayoría de las lesiones relacionadas con cáncer cervical (8,9). En vista de las reiteradas fallas del diagnóstico rutinario, algunos autores consideran fundamental la inclusión de

Trabajo subvencionado a través del CONICIT, según proyecto N° S1-96001789.

Recibido: 14-01-00

Aceptado para publicación: 04-03-00

pruebas moleculares para el estudio de pacientes que acuden a las consultas de ginecología (10,11) y en tal sentido se diseñó el presente trabajo, en mujeres que acudieron a la consulta de prevención del cáncer de cuello uterino de la Sociedad Anticancerosa de Mérida, Edo. Mérida, con la finalidad de estudiar la presencia de VPH cervical por el método de captura de híbridos (MCH) del ADN viral y la citología de células cervicales exfoliadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron a mujeres entre 16 y 52 años de edad con actividad sexual, que acudieron a la clínica de prevención del cáncer de la Sociedad Anticancerosa de la ciudad de Mérida, Edo. Mérida (junio 1996-junio 1997). Se excluyeron pacientes con sangrado genital, procedimientos quirúrgicos previos; embarazo o tratamiento inmunosupresor. Luego de la aplicación de una encuesta para la recolección de datos clínicos, previo consentimiento de la paciente y de la comisión correspondiente, se procedió a la toma de muestras endo y exocervical.

Toma de muestras y procesamiento

Se tomó una muestra exocervical con espátula de Ayre y un hisopado endocervical (hisopo de dacrón) para la citología, coloreada de acuerdo a la técnica de Papanicolaou (2) y evaluada según los criterios pautados por la clasificación Bethesda (12). Se tomó otra muestra endocervical, exocervical y de la zona de transformación con un hisopo de dacrón, el cual se introdujo en el medio de transporte ViraPap (*Digene Diagnostics, Inc. Silver Spring, Maryland, EE.UU.*). La muestra se almacenó a -20°C hasta la realización del MCH. El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen: luego de la desnaturalización calórica y alcalina, el ADN liberado se hibridó por separado con una mezcla de sondas de ARN de subtipos de VPH de bajo riesgo (VPH-6, 11, 42, 43, 44) y una mezcla de sondas de ARN de VPH de alto riesgo (VPH-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56). Los híbridos de ADN/ARN formados fueron capturados en tubos sensibilizados con anticuerpos monoclonales contra los híbridos, los cuales se hicieron reaccionar con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina que, unidos al substrato (Lumi-Phos 530), generaron una reacción de quimioluminiscencia medida por un luminómetro (DCR-1

de *Digene Diagnostics, Inc, Silver Spring, Maryland EE.UU.*). Cada vez que se procesaron las muestras, se incluyeron controles negativos y controles positivos por triplicado (para ambos grupos de riesgo y por separado).

Análisis estadístico

Se creó una base de datos en el programa EPI-Info V.6 IBM compatible. Se utilizó el análisis simple y estratificado de las tablas de contingencia contenidos en este programa estadístico. Para el análisis de inferencia, se utilizó el estadístico Chi-cuadrado (X^2) y sólo la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Para comparar ambos métodos diagnósticos se utilizó el estadístico Kappa.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 101 mujeres en aparente buen estado general de salud. Todas las pacientes incluidas habían iniciado actividad sexual y referían al menos una pareja sexual. El examen ginecológico demostró que 98 pacientes (97%) no presentaron lesiones aparentes en los genitales externos, 2 presentaron intertrigo y sólo 1 paciente, lesión compatible con condiloma acuminado en labios menores.

En el Cuadro 1 puede observarse que el diagnóstico citológico reveló que 84 pacientes (84,2%) presentaron algún tipo de alteración en las células cervicales, mientras que el 15,8% correspondió a componente celular normal.

El estudio de muestras procesadas por el MCH, resultó positivo para VPH en 10 pacientes (9,9%) (Cuadro 2). De éstas, 7 presentaron VPH de alto riesgo, 1 paciente presentó VPH de bajo riesgo y en 2 casos, ambos grupos de riesgo. Las 10 pacientes positivas para VPH por captura de híbridos pertenecieron al grupo de edad comprendido entre 15 y 35 años.

Todas aquellas pacientes con diagnóstico normal (16 en total), fueron negativas para VPH por el método de captura de híbridos. De 12 pacientes que presentaron citología compatible con lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de bajo y alto grado, dos resultaron positivas por captura de híbridos. De aquellas pacientes quienes presentaron otras alteraciones citológicas como "cambios celulares reactivos", "atipias indeterminadas", etc. (73 pacientes), 8 resultaron positivas para VPH por el MCH (Cuadro 3).

INFECCIÓN CERVICAL POR VPH

Cuadro 1
Resultados del estudio citológico

Diagnóstico citológico	N° de pacientes	Acumulado	
		%	%
Atipias indeterminadas	23	22,8	22,8
Cambios celulares reactivos	50	49,5	72,3
*LIE: de alto grado	2	2,0	74,3
*LIE: bajo grado	10	9,9	84,2
Componente celular normal	16	15,8	100
Total	101		

* LIE: Lesión intraepitelial escamosa.

Cuadro 2
Resultados del estudio por el método de captura de híbridos

Diagnóstico por captura de híbridos	N° de pacientes	
	N°	%
Positivas	10	9,9
Negativas	91	90,1
Total	101	

Cuadro 3
Comparación de los resultados entre la citología y captura de híbridos del ADN viral

Diagnóstico citológico	N° de pacientes	Captura de híbridos	
		Positivas	Negativas
Atipias indeterminadas	23	3	20
Cambios celulares reactivos	50	5	45
* LIE: bajo grado	10	2	8
* LIE: alto grado	2	0	2
Normal	16	0	16
Total	101	10	91

* LIE: Lesión intraepitelial escamosa.

La correlación entre ambos métodos diagnósticos demostró que la sensibilidad de la citología para el diagnóstico de VPH fue del 20% (IC: 3,5-55,8); la copositividad entre ambas pruebas fue de dos pacientes y la especificidad fue del 89% (IC: 80,3-94,3). El valor predictivo positivo de la citología fue del 16,6% (IC: 2,9-49,1); mientras que el valor predictivo negativo fue del 91% (IC: 82,6-95,8). No

hubo correlación estadísticamente significativa entre la citología y el MCH para establecer el diagnóstico de VPH ($X^2 = 0,69$ [corregido]. $p = 0,4055$). De igual forma resultó el valor del estadístico Kappa para la comparación entre ambos métodos ($K = 0,082745$. $Z = 0,84$ $p = 0,201598$ [1 cola]).

DISCUSIÓN

El diagnóstico de infección cervical por VPH se realiza generalmente por estudios clínicos, citológicos e histopatológicos (13,14) y en Venezuela, como en otros países, no se emplean en forma sistemática las técnicas modernas de biología molecular que garantizan la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de infección por VPH, además de permitir la instauración de decisiones terapéuticas más precisas. La aplicación del MCH en células exfoliadas de cuello uterino en 101 mujeres reveló una casuística del 9,9% de infección por VPH en mujeres sexualmente activas y con diferentes diagnósticos citológicos. Otros autores han reportado prevalencia que varían entre 10% a 70% (1,15-18). Esto puede deberse a diferencias metodológicas importantes en las técnicas citológicas y de hibridación empleadas, así como en la muestra de población seleccionada. A pesar de que en estos estudios se utilizan diferentes métodos de hibridación, los resultados son comparables, por cuanto se ha observado una correlación estadísticamente significativa, mayor del 90%, entre pruebas basadas en *Southern Blot*, captura de híbridos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés).

En el presente trabajo, donde se comparan los resultados del diagnóstico citológico, con el MCH, no hubo correlación estadísticamente significativa entre ambas pruebas para establecer la presencia de VPH. En 12 pacientes con diagnóstico citológico de LIE (bajo y alto grado), sólo se demostró la presencia de ADN viral en 2. Esto difiere con lo reportado por diversos autores quienes han demostrado buena correlación entre las citologías con características de LIE, especialmente de alto grado, y la detección del ADN de VPH (11,19-22). Estas diferencias pudieran explicarse por la variabilidad que existe entre observadores y laboratorios. Además, cabe señalar que en este estudio se evaluó cada citología en una oportunidad y por un solo observador. Sin embargo, debe reconocerse que los subtipos incluidos en la prueba comercial por nosotros empleada no abarcan todos los subtipos responsables de infección cervical por VPH.

En este estudio, ninguna de las citologías clasificadas como componente celular normal, demostró la presencia del ADN viral, a pesar de que muchos autores han confirmado la presencia de VPH en mujeres con citología normal (17,23-25). Esto pudiera explicarse por el limitado número de pacientes estudiado.

La citología de células cervicales es un método subjetivo y poco sensible para establecer el diagnóstico de infección por VPH. No se niega el extraordinario valor de la misma en el despistaje de cáncer cervical; no obstante, la detección de VPH por captura de híbridos comercialmente disponible, es un método sensible para evidenciar infecciones latentes o lesiones cervicales subclínicas y puede ser útil en la identificación de pacientes con tipos específicos de VPH y el riesgo de desarrollar cáncer cervical. Es muy conveniente su utilización rutinaria para agilizar y afinar el diagnóstico con miras a la aplicación precoz de medidas terapéuticas efectivas.

REFERENCIAS

- Lörincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin N Am* 1996;23:707-730.
- Schneider V. Microscopic diagnosis of HPV infection. *Clin Obstet Gynecol* 1989;32:148-156.
- Coggin JR, zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res* 1979;39:545-551.
- Lörincz AT, Schiffman MH, Jaffurs WJ, Marlowe J, Quinn AP, Temple GF. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytology abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:645-651.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen PA, Beckman AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1272-1278.
- Cox JT, Lörincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:946-954.
- Cuzick J, Szarewski A, Terry G, Ho L, Hanby A, Maddox P, et al. Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 1995;345:1533-1536.
- Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812-3815.
- Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman R. Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-337.
- Robertson AJ, Anderson JM, Beck JS, Burnett RA, Howatson SR, Lee FD, et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1989;42:231-238.
- Sherman ME, Schiffman MH, Lörincz AT, Manos MM, Scott DR, Kurman RJ, et al. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology. Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high risk human papillomavirus types. *Am J Clin Pathol* 1994;102:182-187.
- The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. *Acta Cytological* 1993;37:115-124.
- Stone KM. Human papillomavirus infection and genital warts: Update on epidemiology and treatment. *Clin Infect Dis* 1995;20(Suppl 1):91-97
- Verdon ME. Issues in the management of human papillomavirus genital disease. *Am Fam Phys* 1997;55:1813-1822.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Viladiu P, Tormo J, Moreo P, et al. El virus del papiloma humano en la etiología del cáncer cérvicouterino. *Bol Of Sanit Panam* 1993;115:301-308.
- Kurz J, Mitra K, Adam R, Miao X, Mackay JS, Isa NN, et al. PCR detection and typing of genital papillomavirus in a New Brunswick population. *Int J Cancer* 1993;55:604-608.
- Mugica van Herckenrode C, Malcolm AD, Coleman DV. Prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in Basque Country women using slot-blot hybridization: A survey of women at low risk of developing cervical cancer. *Int J Cancer* 1992;51:851-886.
- Syrjanen KJ. Human papillomavirus in genital carcinogenesis. *Sex Transm Dis* 1994;21(Suppl):86-89.
- Bavin PJ, Giles JA, Hudson E, Williams D, Crow J, Griffith PD, et al. Comparison of cervical cytology and the polymerase chain reaction for HPV 16 to identify women with cervical disease in a general practice population. *J Med Virol* 1992;37:8-12.
- Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994;47:649-652.
- Burk RD, Kadish AS, Calderin S, Rommey SL. Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: Correlation with biopsy and Papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:982-989.

INFECCIÓN CERVICAL POR VPH

22. Evander M, Edlund K, Boden E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of a one-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992;30:987-992.
 23. De Sanjosé S, Santamaría M, Alonso de Ruiz P, Aristizábal N, Guerrero E, Castellsague X, et al. HPV types in women with normal cervical cytology. *IARC Sci Publ* 1992;119:75-84.
 24. Wheeler CM, Parmenter CA, Hunt WC, Becker YM, Greer CE, Hildesheim A, et al. Determinants of human papillomavirus infection among cytologically normal woman attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm Dis* 1993;20:286-289.
 25. Schneider A, Zahm DM, Kirchmayr R, Schneider VL. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: Yalidity of cytologic study, cervicography and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1534-1541.
-