

Detección del virus papiloma humano: influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión intraepitelial cervical

Drs. Coralia Carrillo Alessandro*, Gabriela López García *, Mireya González Blanco **, Lyadavina Caraballo*, Carolina Venegas*

RESUMEN

Objetivo: Identificar la influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión, en la detección del ácido desoxirribonucleico del virus papiloma humano mediante reacción en cadena de polimerasa.

Método: Entre octubre 2008 y enero 2009, se seleccionaron 68 pacientes con diagnóstico histológico de lesión intraepitelial. Se realizó la detección del ácido desoxirribonucleico de virus papiloma humano a través de reacción en cadena de polimerasa, en muestra citológica e histológica de cuello uterino. Se analizaron los resultados agrupados según tipo de muestra (citológica o histológica) y tipo de lesión intraepitelial (alto o bajo grado).

Ambiente: Servicio de Ginecología de la Maternidad "Concepción Palacios"

Resultados: La sensibilidad de la reacción en cadena de polimerasa para la detección del ácido desoxirribonucleico del virus papiloma humano en muestra histológica fue 92,98 %, mayor que la citológica 72,06 % ($P < 0,05$). La severidad de la lesión no afectó la capacidad global de detección de la prueba ($P > 0,05$). En lesiones de bajo grado la sensibilidad del extendido fue de 65 % y la de la biopsia fue de 97,2 %; mientras que en las lesiones de alto grado fue de 82,14 % (extendidos) y 85,71 % (biopsias).

Conclusiones: La severidad de la lesión intraepitelial (alto o bajo grado) no afecta la eficacia de la prueba para detectar el ácido desoxirribonucleico del virus papiloma humano. La detección fue más efectiva en muestras histológicas que en citológicas.

Palabras clave: Virus papiloma humano. Reacción en cadena de polimerasa. Lesiones intraepiteliales de alto grado. Lesiones intraepiteliales de bajo grado.

SUMMARY

Objective: Identify the influence of the kind of sample and the severity of the injury, to detect the desoxyribonucleic acid of the human papilloma virus using polymerase chain reaction.

Method: Between October 2008 and January 2009, 68 patients with histological diagnosis of intraepithelial lesion were selected, making detection of human papilloma virus desoxyribonucleic acid in polymerase chain reaction, in both, histological and cytological cervical sample. Analysed the results grouped by type specimen (cytological and/or histological) and type of lesion (high or low grade).

Setting: Service of Gynecology of the Maternidad "Concepcion Palacios",

Results: The sensitivity of the polymerase chain reaction for the detection of human papilloma virus desoxyribonucleic acid in histological sample was 92.98 %, higher than the cytological 72.06 % ($P < 0.05$). The severity of the lesions didn't affect the detection capability of polymerase chain reaction. ($P > 0.05$). The sensitivity of the extended in low grade lesions was 65 % and the biopsy was 97.2 %; while in high-grade lesions was 82.14 % (extended) and 85.71 % (biopsies).

Conclusions: The severity of intraepithelial lesion (high or low grade) does not affect the effectiveness to detect human papilloma virus desoxyribonucleic acid. Detection was more effective in histological samples than in cytological.

Key words: Human papillomavirus. High-grade intraepithelial lesions. Low grade intraepithelial lesions. Polymerase chain reaction.

* Médicos especialistas en obstetricia y ginecología, egresados del Curso de Especialización en Obstetricia y Ginecología de la Universidad Central de Venezuela, con sede en el Hospital Maternidad "Concepción Palacios".

** Jefa del Servicio de Ginecología y Directora del Curso de Especialización en Obstetricia y Ginecología de la Universidad Central de Venezuela, con sede en el Hospital Maternidad "Concepción Palacios".

INTRODUCCIÓN

La infección genital por virus papiloma humano (VPH) es una de las más comunes infecciones de transmisión sexual (1). El VPH se ha encontrado casi en el 95 % de las biopsias de carcinomas cervicouterinos

(2), y ha sido señalado como la principal causa del cáncer de cuello uterino por la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1992 (3). Muchos estudios han mostrado que el VPH está en relación con la aparición tanto de lesiones premalignas como cáncer avanzado (4). Mundialmente, se calculan 500 000 nuevos casos de cáncer cervicouterino invasor anuales (5). En Estados Unidos, la incidencia es 8,3 casos por 100 000 mujeres, aproximadamente 14 000 nuevos casos y 5 000 muertes anuales (6). En Venezuela, el cáncer de cuello uterino produjo 1 215 muertes en 2007 (12,96 % de todas las muertes por cáncer en el sexo femenino), según el registro central de cáncer del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) publicado en 2009 (7), es la segunda causa de muerte oncológica femenina después del cáncer de mama que causó 1 465 fallecidas en ese período (15,63 % de todas las muertes por cáncer en la mujer). Cada año se detectan 3 000 casos nuevos en las edades comprendidas entre 25 y 64 años. Diferentes estudios en la población venezolana señalan una incidencia variable de infección por VPH, que oscila entre un 40 % hasta un 85 %. El genotipo de mayor circulación en Venezuela es el VPH de tipo 16 (8). En la historia natural de la enfermedad, destaca la existencia de una etapa preclínica fácilmente demostrable mediante las técnicas actuales de diagnóstico, y en nuestro medio, en ausencia de la vacuna y hasta tanto la misma sea aprobada por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, el adecuado diagnóstico y tratamiento de las lesiones precursoras es nuestra principal vía para hacer prevención y reducir las tasas de mortalidad por esta causa.

Uno de los más importantes descubrimientos en los últimos 50 años en la patología cervical es la fuerte asociación entre la infección por VPH y el cáncer cervical (9,10). Estudios recientes señalan que la adquisición de una infección por VPH precede y puede predecir la aparición de una lesión intraepitelial escamosa (LIE) o un carcinoma invasor, y que existe una correlación de causa-efecto entre esta infección y la enfermedad cervical (3). La relación entre lesión intraepitelial cervical y este virus también ha sido discutida previamente, la presencia de esta infección está altamente relacionada con la fisiopatología de dicha neoplasia (11,12).

A través de los años, se han descrito más de 200 tipos de VPH y estos han sido clasificados en 16 grupos. Los VPH de tipo genital se clasifican de acuerdo con el potencial para provocar cambios malignos en el epitelio cervical en 3 tipos: 1- de alto riesgo: (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,

58, 59, 68, 73 y 82), capaces de producir neoplasias intraepiteliales cervicales potencialmente invasivas, 2- de riesgo intermedio: (26, 53 y 66) y 3- de bajo riesgo: (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108), que producen cambios benignos (condilomas acuminados y lesiones intraepiteliales de bajo grado) (13,14). La agencia internacional de investigación del cáncer de la OMS, clasifica a los serotipos 16 y 18 como carcinogénicos, los subtipos 31 y 33 como probablemente carcinogénicos y otros subtipos exceptuando el 6 y 11 como posiblemente carcinogénicos. En un estudio del Instituto Nacional del Cáncer se observó que cerca del 10 % de las mujeres con el tipo 16 ó 18 del VPH desarrolló la enfermedad cervical precancerosa avanzada (NIC III) en un lapso de 3 años y un 20 % lo desarrolló en 10 años (comparado al 4 % de mujeres con cualquier tipo de VPH) (15).

La infección por VPH puede presentarse de diversas formas clínicas y es por esta razón que a través del tiempo se han utilizado diferentes métodos para realizar el diagnóstico de esta enfermedad. Las principales pruebas usadas son la citología, la colposcopia, la histología y técnicas como inmunohistoquímica, microscopía electrónica y análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN).

Debido a la introducción de la citología como método de pesquisa del cáncer cervicouterino, se ha observado una disminución de la mortalidad por esta causa en los últimos 50 años, que se debe a la capacidad de esta prueba para detectar lesiones preinvasoras y cáncer invasor temprano. La citología convencional tiene una especificidad de 98 % y una sensibilidad de 51 % para la detección de lesiones premalignas y malignas de cuello. La repetición de los frotis citológicos disminuye muy poco el índice de falsos negativos. Específicamente en el diagnóstico de la infección por VPH, el valor del estudio citológico acusa ciertas limitaciones, debido a que en diferentes series publicadas, citologías reportadas como normales se asociaron a una alta detección de infección por VPH a través de métodos histológicos o de biología molecular (7).

Otro de los métodos ampliamente utilizado es la colposcopia que constituye un procedimiento indispensable para el diagnóstico de infección subclínica por VPH. Aunque la colposcopia es esencialmente superior a la citología para el diagnóstico de infección por VPH, resulta poco fiable para distinguir una infección aislada por el virus, de una infección asociada a una lesión intraepitelial, a excepción de pocos casos (16). Incluso en manos

expertas, es posible que con la colposcopia no se observe la infección hasta en un 15 % de las pacientes. Además, este método no permite predecir el carácter específico del tipo de VPH subyacente.

Aunque se hicieron grandes avances durante el decenio de 1980 en cuanto al conocimiento de la evolución natural de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y su relación con el VPH, la mala sensibilidad y especificidad de métodos como la citología cervical, produjo cálculos muy bajos del efecto de la relación entre infección por VPH, actividad sexual y neoplasia cervicouterina (17). Los exámenes para la detección del VPH han cobrado gran interés por su potencial uso en programas de prevención de cáncer cervical. Los métodos actuales para el diagnóstico de la infección por VPH se basan en técnicas moleculares de detección del ADN. Se han ensayado diferentes métodos diagnósticos con la finalidad de aumentar su efectividad en la pesquisa del VPH (18). Debido a que es difícil cultivar el VPH, las pruebas se basan en la detección y tipificación a través del ácido nucleico. Los exámenes de detección de ADN de VPH son 15 % a 20 % más sensibles que el frotis de Papanicolaou convencional pero menos específicos (19).

Desde los años noventa, la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ha sido considerada la técnica patrón de oro para la detección del VPH, a pesar de sus desventajas que se fundamentan en el potencial de contaminación que conlleva a falsos positivos. Este método consiste en una técnica enzimática muy sofisticada que amplifica al menos un millón de veces las secuencias específicas de ADN diana en la muestra de examen, y puede aplicarse en el tejido fresco o fijado (20).

Dos sistemas de PCR se han usado ampliamente y son capaces de diagnosticar la infección por VPH: el primer par GP5+/6+ y degeneración primaria MY09-11 (21). Ambos amplifican secuencias en la región L1 del genoma del virus papiloma. Actualmente no se ha definido cuál método de PCR para VPH es mejor, porque ambos son casi equivalentes para uso *in vitro* (22).

Es importante considerar que la asociación entre la infección por VPH y las lesiones intraepiteliales es del 100 % (23) por lo cual, en pacientes con diagnóstico histológico de lesión intraepitelial no existen falsos positivos para la prueba, pero sí podrían presentarse falsos negativos, que dependen en mayor o menor grado de errores en la toma de muestra y material degenerado.

En Venezuela, en el año 2003, Alfonso y col. (24) estudiaron la prevalencia de la infección por el VPH

en sujetos aparentemente sanos, una población de estudiantes de la Universidad Central de Venezuela. Obtuvieron un 63,7 % de positividad en mujeres en edad reproductiva, en muestras tomadas por hisopado. En el mismo estudio se realizó asociación entre el diagnóstico molecular por PCR y el método histopatológico, demostrando que solo el 47,8 % de las muestras que presentaban cambios sugestivos de infección por VPH, eran positivas para la infección por el virus pero la determinación fue mayor (80 %) cuando el estudio histopatológico arrojaba lesiones intraepiteliales. En Carabobo, en pacientes de la consulta ginecológica, la prevalencia del VPH por PCR fue un 34,5 %, mientras que la citología solo detectó un 18,2 % (25). Alfonso y col. (26) en 2001 estudiaron a 1 046 mujeres, observaron un 45 % de muestras positivas de VPH de alto riesgo oncogénico en pacientes con citología normal. En la Maternidad "Concepción Palacios", en 2006, Martín y col. (27) realizaron la comparación entre la captura de híbrido II y la PCR para la detección de VPH, demostrando que tienen la misma efectividad, sin embargo, esta disminuye según la lesión aumente en severidad. En España para 2006, Cañadas y col. (28) estudiaron 166 mujeres a quienes se les realizó detección de VPH por diferentes métodos (PCR y CH II), observaron positividad en un 24,7 % y 29,5 % respectivamente. En México para 2003, Rodríguez-Reyes y col. (29) estudiaron en 111 mujeres la tipificación del VPH, 93 % no presentaban alteraciones cervicales a la colposcopia, sin embargo, el 2,15 % fueron positivas para VPH. En contraste, 18 pacientes tenían alteraciones cervicales a la colposcopia, de las cuales el 94,44 % fue positivo. Trottier y col. (30) concluyeron en su estudio de infección por VPH con múltiples genotipos, que actuaba de forma asinérgica en la carcinogénesis cervical por lo que encontraron importantes implicaciones en el manejo de las lesiones.

Peyton y col. (31) compararon la citología en base líquida y el hisopado cervical y concluyeron que tiene mayor sensibilidad el hisopado que la citología en base líquida para la detección del ADN viral.

La severidad de la lesión afecta la detección viral según publicaciones internacionales. Lesiones de alto grado presentan mayor distorsión histopatológica, por lo que hay menor eficacia de los procedimientos que se practican para la detección del VPH (32).

El objetivo del presente estudio fue identificar la influencia del tipo de muestra y la severidad de la lesión, en la detección del VPH con PCR, en las pacientes con diagnóstico histológico de lesión

intraepitelial que acudieron al Servicio de Ginecología de la Maternidad “Concepción Palacios” desde octubre de 2008 a enero de 2009.

La identificación con certeza del tipo de virus en diagnósticos dudosos, como atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS), y en casos de difícil tratamiento, como la infección por VPH en endocérvix, puede orientar acerca de la conducta a seguir en vista de la mayor frecuencia de evolución a una lesión intraepitelial de alto grado (LIE Ag) que tiene la infección producida por ciertos genotipos. La infección por VPH representa un alto riesgo oncogénico para su portadora, y se sabe que las mujeres portadoras de lesiones intraepiteliales de cualquier grado, necesariamente tendrán el virus, en vista de la asociación directa entre la infección y la enfermedad, de ahí que se considere que la infección viral es absolutamente necesaria en estas pacientes. La detección y conocimiento de genotipo viral permitiría establecer el plan de trabajo para cada paciente y lograr la prevención a futuro con vacunas específicas. Existen diversas pruebas para la detección viral, aunque en nuestro medio la más usada es la PCR. La identificación de todas aquellas variables que afecten la sensibilidad y especificidad de la prueba es de vital importancia para el reconocimiento de la utilidad real de la prueba. La evaluación del tipo de muestra y la severidad de la lesión como variable que afecte la efectividad de la prueba no ha sido realizada en Venezuela.

MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo, descriptivo, comparativo, transversal que se realizó en una población de pacientes que acudió al Servicio de Ginecología de la Maternidad “Concepción Palacios” entre octubre de 2008 y enero de 2009. De ellas se seleccionó una muestra de 68 pacientes que tenían informe histológico de lesión intraepitelial cervical. Se excluyeron aquellas con sangrado genital activo.

A todas las pacientes se les citó al Servicio de Ginecología y previa firma del consentimiento informado, se les llenó una hoja de registro, con todos los datos personales y antecedentes médicos pertinentes. Luego las pacientes se colocaron en posición ginecológica, se procedió a la inserción de espéculo de Graves, ubicación del cuello uterino y toma de muestra con cepillo citológico en endo y exocérvix; dicha muestra fue colocada en un tubo de plástico con medio de transporte, se les tomó una muestra de endo y exocérvix con cepillo citológico y se

identificaron los bloques de parafina correspondientes a las biopsias donde se hizo el diagnóstico histológico; ambas muestras, cepillado y tejido incluido en parafina fueron enviadas al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología, del Ministerio del Poder Popular para la Salud, en la Universidad Central de Venezuela. El procesamiento de las muestras mediante la PCR fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACID) e incorporado al proyecto Nro. G 2005000408. Se comparó en cada grupo la eficacia de la PCR para la detección según el tipo de muestra. Además se comparó la eficacia del método para el diagnóstico entre las pacientes con LIE Ag y Bg.

Los resultados fueron descritos mediante frecuencias absolutas, porcentajes, media y desviación estándar, comparados por diferencias de proporciones y aproximación a la curva normal para una $P < 0,05$ cuyos valores topes son 1,96 y 2,58 respectivamente. La eficacia de la prueba en cada caso se midió mediante el cálculo de la sensibilidad. Para ello se excluyeron las muestras degeneradas y las insuficientes. Los resultados fueron presentados mediante cuadros y/o gráficos estadísticos diseñados para tal fin.

RESULTADOS

En el período de octubre de 2008 a enero de 2009 fueron evaluadas 1 616 pacientes en el Servicio de Ginecología de la Maternidad “Concepción Palacios”, de las cuales se incluyeron en esta investigación sesenta y ocho, quienes cumplieron con los criterios establecidos, se evaluaron 136 muestras, 68 por cepillado cervical y 68 por biopsia.

En el Cuadro 1 se presentan las características epidemiológicas de las pacientes, quienes tuvieron una edad promedio de $33,1 \pm 10,5$ años, el inicio de las relaciones sexuales fue a los $17,2 \pm 3,4$ años. La moda para el número de parejas sexuales fue 2 igual que para la paridad. El uso de anticonceptivos orales fue referido por 42 (61,8 %) pacientes y se declararon fumadoras 30 (44,1 %). Un 58,8 % de las pacientes presentaron lesiones de bajo grado y 41,2 % de alto grado (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 vemos que del total de pacientes evaluadas, 72,06 % fueron positivas para VPH cuando la muestra se obtuvo por cepillado cervical y 77,9 % cuando la muestra fue obtenida por biopsia. Se encontró un 8,8 % de material degenerado y 7,4 % de material insuficiente en las muestras histológicas. La sensibilidad de la prueba en muestra citológica fue 72,06 y en biopsia 92,98. Esta diferencia fue

estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Cuando se separan los casos según el grado de lesión, observamos que en las pacientes con LIE Bg, hubo 87,5 % (35/40) de detección en la muestra histológica, con una sensibilidad de 97,2 %. El porcentaje de detección fue de solo 65 % (26/40) en

Cuadro 1

Características epidemiológicas de la muestra

VARIABLES	ESTADÍSTICO
Edad (años) *	33,1 ± 10,5
Inicio de relaciones sexuales (años) *	17,2 ± 3,4
Parejas sexuales †	2 (1-7)
Paridad †	2 (0-15)
Uso de anticonceptivos orales ‡	61,8
Tabaquismo ‡	44,1

* X ± DE

† Moda (mínimo – máximo)

‡ %

Cuadro 2

Distribución de pacientes según el hallazgo histológico

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS	f	%
LIE Bg	40	58,8
LIE Ag	28	41,2
Total	68	100,0

Cuadro 3

Detección del ADN viral por reacción en cadena de polimerasa según el tipo de muestra

ADN virus papiloma humano	Cepillado cervical		Biopsia cervical	
	f	%	f	%
Positivo	49	72,06	53	77,9
Negativo	19	27,94	4	5,9
Muestras insuficientes	0	0,0	5	7,4
Muestra degenerada	0	0,0	6	8,8
Total	68	100,0	68	100,0

P < 0,05

Sensibilidad del cepillado: 72,06

Sensibilidad de la biopsia: 92,98

las muestras citológicas ($P < 0,05$). En el caso de los LIE Ag, encontramos 64,3 % de positividad en las muestras de biopsia (18/28) para una sensibilidad de 85,71 % y 82,1 % en muestras por cepillado (23/28). Estas diferencias no fueron significativas (Cuadros 4 y 5).

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de la detección del ADN viral por PCR según la severidad de la lesión, independientemente del tipo de muestra en la que se hiciera la detección, 39 pacientes con LIE Bg (97,5 %) y 26 pacientes con LIE Ag (92,9 %) fueron positivas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

El Cuadro 7 presenta el número de genotipos

Cuadro 4

Detección del ADN viral por reacción en cadena de polimerasa según el tipo de muestra en lesiones intraepiteliales de bajo grado

ADN virus papiloma humano	Cepillado cervical		Biopsia cervical		P
	n	%	n	%	
Positivo	26	65,0	35	87,5	< 0,05
Negativo	14	35,0	1	2,5	< 0,01
Muestras insuficientes	0	0,0	1	2,5	
Muestra degenerada	0	0,0	3	7,5	
Total	40	100,0	40	100,0	

Sensibilidad en lesiones de bajo grado por cepillado: 65 %

Sensibilidad en lesiones de bajo grado, por biopsia: 97,2 %

Cuadro 5

Detección del ADN viral por reacción en cadena de polimerasa según el tipo de muestra en lesiones intraepiteliales de alto grado

ADN virus papiloma humano	Cepillado cervical		Biopsia cervical		P
	n	%	n	%	
Positivo	23	82,1	18	64,3	> 0,05
Negativo	5	17,9	3	10,7	> 0,05
Muestras insuficientes	0	0,0	4	14,3	
Muestra degenerada	0	0,0	3	10,7	
Total	28	100,0	28	100,0	

Sensibilidad en lesiones de alto grado, por cepillado: 82,14 %

Sensibilidad en lesiones de alto grado, por biopsia: 85,71 %

DETECCIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO

virales que se detectaron por ambos métodos. En las 49 muestras positivas por cepillado cervical, la coinfección con dos genotipos representó el mayor porcentaje de casos, con un 23 %, la presencia de un solo genotipo viral la observamos en el 17 %. Se identificaron 3 o más genotipos en 9 casos (18,3 %). En las muestras histológicas la coinfección con dos genotipos representó el 41,86 %, la presencia de un solo genotipo viral es del 18,6 %. El virus no fue tipificable en 16 muestras (37,21 %).

Entre las pacientes en quienes se detectó un solo genotipo por hisopado, hubo 12/17 casos (24,4 %) de virus de bajo riesgo, 3/17 de virus de alto riesgo (6,1 %) y un 4,2 % de virus de grado intermedio. Todas las muestras histológicas positivas para VPH con un solo genotipo, correspondieron a virus de bajo riesgo. Hubo un 37,21 % de muestras en las cuales se obtuvo un virus no tipificable (Cuadro 8).

Cuadro 6

Detección del ADN viral por reacción en cadena de polimerasa según la severidad de la lesión

ADN virus papiloma humano	Lesión intraepitelial de bajo grado		Lesión intraepitelial de alto grado	
	n	%	n	%
	Positivo	39	97,5	26
Negativo	1	2,5	2	7,1
Total	40	100,0	28	100,0

P > 0,05

Sensibilidad en lesiones de bajo grado: 97,5 %

Sensibilidad en lesiones de alto grado: 92,85 %

Cuadro 7

Distribución de los casos según el número de genotipos virales identificados

ADN viral	Cepillado		Biopsia	
	f	%	f	%
1 Genotipo	17	34,7	8	18,60
2 Genotipos	23	47	18	41,86
3 o más genotipos	9	18,3	1	2,33
No tipificable	0	----	16	37,21
Total	49	100,0	43	100,0

Cuadro 8

Distribución de los casos según los genotipos virales identificados

ADN viral	Cepillado		Biopsia	
	f	%	f	%
6	6	12,2	4	9,30
11	6	12,2	4	9,30
16	2	4,1	0	----
33	2	4,1	0	----
18	1	2,0	0	----
6, 11	7	14,3	16	37,21
6, 18	6	12,2	0	----
6, 16	4	8,2	1	2,33
6,11, 33	6	12,2	1	2,33
Otras combinaciones	9	18,4	1	2,33
No tipificable	0	----	16	37,21
Total	49	100,0	43	100,0

DISCUSIÓN

Los métodos de detección del VPH han evolucionado en la búsqueda de una mayor sensibilidad y facilidad en su aplicación, dichos exámenes han cobrado gran interés por su posible utilización en programas de prevención del cáncer cervical. Los métodos actuales para el diagnóstico de la infección por VPH se basan en técnicas moleculares de detección del ADN viral (33).

Debido a la imposibilidad del VPH para multiplicarse en los sistemas celulares, el diagnóstico de esta infección fue un problema complejo durante muchos años; con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se han creado métodos de detección para este importante patógeno. Una de las técnicas más utilizadas es la PCR que ha tenido una gran aceptación debido a su sensibilidad, especificidad y posibilidades de automatización (33).

La PCR es un método con alta efectividad porque amplifica fragmentos de ADN del virus a partir de pocas cantidades del mismo (menos de 1 µg), este puede estar parcialmente degradado y además, la técnica puede ser utilizada para analizar un gran número de muestras en un tiempo corto (34-36).

Teóricamente existe una asociación bien fundamentada entre la fisiopatología de las lesiones intraepiteliales y la presencia indispensable, como factor etiológico, de la infección por el VPH (23), lo que nos permitió estudiar la identificación del virus del VPH en diferentes tipos de muestra; así

como la relación con la severidad de la lesión. En este estudio se incluyeron pacientes en las cuales se detectó la presencia de una lesión intraepitelial cervical, confirmada por histología. Según Bosch y col. (37) la presencia del virus es un factor etiológico indispensable en estos casos, por lo que todas las muestras debían ser positivas para la determinación del ADN viral, por la certeza que proporciona el diagnóstico anatomopatológico. Ello permite afirmar que cualquier resultado negativo debe considerarse un falso negativo, con el consecuente efecto sobre la sensibilidad de la prueba.

Se compararon los resultados obtenidos en los dos tipos de muestra más frecuentemente empleados: muestra citológica y biopsia incluida en parafina. Se demostró que la detección es significativamente mayor en muestras histológicas a pesar que estas estaban incluidas en parafina, previa fijación en formol, lo que podría inducir degeneración del ADN viral, con la consecuente pérdida de la capacidad antigénica del material en estudio, bien sea por problemas de fijación o por el procesamiento del mismo (38,39). De hecho en esta serie observamos casos de muestras degeneradas que representan un 8,8 %.

Son pocos los estudios en la literatura que comparan la calidad de las muestras tomadas a través del hisopado o cepillado cervical y otro método de recolección; solo se cita el estudio de Peyton y col. (31) quienes compararon la citología en base líquida y el hisopado cervical y concluyeron que este tiene mayor sensibilidad para la detección del ADN viral.

En nuestra serie, los resultados negativos fueron mayores en las muestras tomadas por cepillado. Estos falsos negativos pueden ser debidos a varios factores, entre los que se incluyen la toma, el transporte y el procesamiento de la muestra (40). En cuanto a la toma se realizó un proceso estandarizado, tal como se describió previamente. Además los bloques de parafina correspondientes a las biopsias de cada paciente, fueron procesados según la técnica habitual.

En relación al transporte, refrigeración y manejo de las muestras, los cepillados y raspados cervicales pueden mantenerse a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 2 semanas, para un almacenamiento más prolongado se requiere de una temperatura de -20°C (20,21,32,41). La estabilidad de los especímenes de ADN almacenados en medios de transporte a -20°C ha mostrado ser de al menos dos años. En este estudio se cumplió con las medidas antes expuestas que garantizan una óptima conservación de las muestras.

En vista que ambos tipos de muestra fueron tratados por igual, se cree que el mayor número

de falsos negativos en el cepillado debe atribuirse a características propias de la muestra. Resulta favorable conocer que el espécimen histológico, incluido en parafina, cuando es suficiente y no está degenerado, puede proporcionar un diagnóstico con una sensibilidad de 92,98 %. La posibilidad de degeneración está por debajo del 10 %.

La PCR aplicada identifica solo los genotipos 6, 11, 16, 18 y 33. Como consecuencia de la limitación de la prueba, se obtuvieron muchas muestras con genotipos no identificables (27). Existe otra prueba para la detección del ADN de VPH, la Captura de Híbrido II (CH II), la cual es capaz de detectar mayor número de genotipos, 18 tipos diferentes de VPH, incluyendo los 5 de bajo riesgo (VPH 6, 11, 42, 43, 44) y los 13 de riesgo alto e intermedio (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) (8). Sin embargo, ambas pruebas tienen una sensibilidad entre 80 % a 100 % para la detección de VPH asociado a neoplasias intracervicales grado II y III, y una especificidad de aproximadamente un 10 % menos que la citología (21,22).

Otro aspecto a considerar en este análisis es la influencia de la severidad de la lesión en la detección del ADN viral. El estudio histopatológico se fundamenta en los cambios celulares provocados por el virus, que se caracterizan por rasgos histológicos como son la coilocitosis, acantosis, disqueratosis, bi y multinucleación, paraqueratosis, hiperqueratosis e hiperplasia epitelial parabasal. Las dificultades de este método recaen en que el efecto citopático resulta evidente en caso de infección aislada, pero es menos claro en asociación a lesiones intraepiteliales, y prácticamente ausente en los casos de cáncer invasor (8). Es así que, desde el punto de vista histológico, los cambios citopáticos inducidos por el virus son más evidentes en las lesiones de bajo grado que en las de alto grado y muy poco evidentes en los cánceres invasores. Según señalan Koliopoulos y col. (32), a mayor distorsión histopatológica, mayor es el impedimento para realizar la identificación del virus, resultando en una menor eficacia de los procedimientos que se practican para la detección del VPH. Esta afirmación es respaldada por otros autores (42,43). A este respecto, nuestros hallazgos son contradictorios. De hecho cuando analizamos las diferencias, independientemente del tipo de muestra, obtuvimos una alta detección en ambos grupos, bajo y alto grado, por encima del 90 %, es decir, el tipo de lesión no afecta el resultado, pero al individualizar según el tipo de muestra, encontramos diferente comportamiento según se tratase de lesiones de bajo

o alto grado. Hubo una mayor detección en lesión intraepitelial de bajo grado en muestras histológicas, lo cual está de acuerdo con lo señalado por Koliopoulos y col. (32), Rincón Morales y col. (42), y Nuovo y col. (43). Sin embargo, cuando evaluamos las lesiones de alto grado, vemos que la detección fue independiente del tipo de muestra.

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos concluir que la detección global del VPH, independientemente del tipo de lesión, es mejor en muestras histológicas. El resultado es evidente en lesiones de bajo grado, no así en las de alto grado. La detección viral global, considerando ambos tipos de muestra, es independiente del grado de la lesión. Entre los genotipos identificados con ambos tipos de muestras predominó la coinfección viral.

En vista de ello recomendamos realizar la PCR en la misma muestra histológica en la que se hizo el diagnóstico histológico, en aquellos casos en donde la identificación del genotipo viral sea requerida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Freddy Bello, por su valiosa colaboración y apoyo para el análisis estadístico. Al Servicio de Anatomía Patológica, de la Maternidad “Concepción Palacios”, por su contribución en la evaluación de las muestras, en especial a la Dra. Livia Carrillo, por su aporte en el análisis histológico. Al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Oncología y Hematología del Ministerio del Poder Popular para la Salud de la Universidad Central de Venezuela, Proyecto FONACIT, por su asesoría y financiamiento en la realización de las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa y a la Dra. María Correnti, por su cooperación en el estudio de las muestras. Al personal de enfermería y secretarías de los Servicios de Ginecología y de Anatomía Patológica, por brindarnos su ayuda oportuna.

REFERENCIAS

1. Stone K. Epidemiologic aspects of genital HPV infection. *Clin Obstet Gynecol* 1989;32:112-118.
2. Bosch F, Manos M, Muñoz N. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:796-802.
3. Muñoz N, Bosch F, De San José S. The casual link between human 4papillomavirus and invasive cervical cancer: A population based case-control studyg Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992; 52: 743-749.
4. Schiffman M, Bauer H, Hoover R. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:958-964.
5. Jenkins D. Diagnosing human papillomaviruses: Recent advances. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14:53-62.
6. Division of STD prevention. Prevention of genital HPV infection and sequelae: Report of an external consultants' meeting. Atlanta Center for Disease Control and Prevention. 1994.
7. Registro Central de Cáncer de Venezuela. Incidencia estimada de cáncer en mujeres en Venezuela para el año 2007. Ministerio Popular para la Salud. 2009.
8. Correnti M, Cavazza M, Alfonso B, Lozada C. La infección por el virus del papiloma humano: un problema de salud pública en Venezuela. 2002. En: www.caibco.ucv.ve.
9. Schiffman MH, Brinton LA, Fraumeni IF Jr., Devesa S. Uterine cervix. En: Schottenfeld D, Fraumeni IF Jr., editores. *Cancer Epidemiology and Prevention.* 2ª edición. Nueva York: Oxford Press; 1996.p.1090-1096.
10. Sherman ME, Kurman RJ. Intraepithelial carcinoma of the cervix. *Cancer.* 1998;83(11):2243-2246.
11. Popper HH, Shabrawi Y, Wockel W, Hofler G, Kenner L, Smolle FM, et al. Prognostic importance of human papilloma virus typing in squamous cell papilloma of the bronchus: Comparison of in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Hum Pathol.* 1994;25(11):1191-1195.
12. Svare EI, Kjaer SK, Smits HL, Poll P, Tjong A, Hung SP. Risk factors for HPV detection in archival Pap smears. A populationbased study from Greenland and Denmark. *Eur J Cancer.* 1998;34(8):1230-1234.
13. ZurHausen: Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999;111:581-587.
14. Muñoz N, Bosch FX, de San José S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-527.
15. Centro Latinoamericano de diagnóstico Genético Molecular. El virus del papiloma humano (VPH) en Venezuela. 2008. En: www.celegem.com.
16. De Palo G, Chanen W, Dexeus S. Patología y tratamiento del tracto genital inferior. Barcelona: Editorial Masson; 2001:8-61.
17. Franco E. Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:779-789.
18. Cox J. Papel clínico de las pruebas de virus del papiloma humano. *Clin Ginecol Obstet. Temas Actuales.* 1996;4:745-783.
19. Apgar B, Brotzman G, Spitzer M. *Colposcopia Principios y Práctica.* México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 2003:89-103.
20. Kulmala S, Syrjanen S, Shabalova I, Petrovichev N, Kazachenko V, Podistov I. Human Papillomavirus

- testing with the Hybrid Capture II assay and PCR as screening tool. *J Clin Microbiol* June. 2004;42:2470-2475.
21. Kosel S, Burggraf S, Moosen J, Engelhardt W, Olgmoller B. Type specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting-improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridization. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:787-791.
 22. Lorincz A. Métodos moleculares para la detección de infección por virus del papiloma humano. *Clin Ginecol Obstet. Temas Actuales*. 1996;3:647-649.
 23. Castellanos M. Cáncer cervicouterino y el VPH. Opciones de detección. *Fac Med UNAM*. 2003;2:63-66.
 24. Alfonso B, Lozada C, Correnti M, Cavazza M, Michelle P, Salma N. Detección del virus del papiloma humano en muestras cervicales de una población de estudiantes de la Universidad Central de Venezuela. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2003;26:120-126.
 25. Reigosa A, Alvarez M, De Vasconcelo M, Cristin R, Salas W. Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. *Salus online*. 2004;8:33-42.
 26. Alfonso B, Lozada C, Correnti M, Cavazza M, Michelle P, Salma, N. Infección por el virus del Papiloma Humano (VPH) en la sociedad actual. En: www.celegem.com.
 27. Martin T, Mora A. Captura de híbrido II y reacción en cadena de polimerasa en la detección del virus papiloma humano. Trabajo Especial de Investigación que se presenta para optar el Título de Especialista en Obstetricia y Ginecología. Caracas (Venezuela): Universidad Central de Venezuela, 2006.
 28. Cañadas M, Lloveras B, Lorincz A, Ejarque M, Font R. Assessment of HPV detection assays for use in cervical cancer screening programs *Salud Pública Mex*. 2006;48(5):373-378.
 29. Rodríguez-Reyes E, Cerda-Flores R, Solís N, Quiñones J, Cortés-Gutiérrez E. Identification and typification of the human papilloma virus in women using the "Timely Detection of Cancer" program in Durango, Mexico. *Ginecol Obstet Mex*. 2003;71:471-475.
 30. Trottier H, Mahmud S, Costa M, Sobrinho J, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1274-1280.
 31. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT. Comparison of PCR and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3248-3254.
 32. Koliopoulos G, Harbin M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskeva E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: A systemic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*. 2007;104: 232-246.
 33. Álvarez M, Chiarello A, Espinal E, Reigosa A, Marrero M. Detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) en un grupo de pacientes con sospecha clínica y/o anatomo-patológica de infección por VPH. *Rev Salus*. 2000;4:1-10.
 34. Lucotte G, Francois MH, Petit MC, Berriche S, Reveilleau S. A multiple primer pairs polymerase chain reaction for the detection of human genital papillomavirus types. *Mol Cell Probes*. 1993;7:339-344.
 35. Monk U, Cook N, Ahn C, Vasilev SA, Barman M, Wilczynski SP. Comparison of the polymerase chain reaction and southern blot analysis in detecting and typing human papilloma virus desoxyribonucleic acid in tumor of the lower female genital tract. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3:283-291.
 36. Adams V, Moll C, Schmid M. Detection and typing of human papillomavirus in biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction ND restriction enzyme analysis: A method suitable for semiautomation. *J Med Virol*. 1996;48:161-170.
 37. Bosch F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah K. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55:244-265.
 38. Lorenzo C. Adenocarcinoma del cuello uterino: Estudio clínico patológico. Noviembre 2002. Trabajo Especial de Investigación que se presenta para optar el Título de Especialista en Anatomía Patológica. Caracas (Venezuela): Universidad Central de Venezuela, 2002.
 39. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, et al. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000;157:1055-1062.
 40. Bonnez W, Reichman RC. Papillomavirus. En: Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and Practica of Infectious diseases. 4ª edición. Nueva York Ed: Mandell GL. 1995.
 41. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, et al. A systemic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess*. 1993;3(14):324-329.
 42. Rincón Morales F. *Ginecología 96*. Caracas: Editorial Artes Gráficas Enedé; 1996:127-148.
 43. Nuovo G, Blanco J, Leipzig S, Smith D. Human papillomavirus detection in cervical lesions nondiagnostic for cervical intraepithelial neoplasia: Correlation with Papanicolaou smear, colposcopy, and occurrence of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*. 1990;75:1006-1011.

Correspondencia a: gabilop20@gmail.com