

Comparación de dos métodos para toma de muestra de fluido exo-endocervical para detección molecular del virus de papiloma humano*

Dr. Henry Aguiar¹, Lcdo. Fernando González², Lcdo. César Pacheco³, Dr. Heriberto Correia⁴, Dra. Nancy Moreno⁴, Dra. Flor Herrera⁴.

RESUMEN

Objetivo: Comparar dos métodos de recolección de muestras de fluido exo-endocervical en la detección molecular de infecciones del virus de papiloma humano.

Métodos: Se tomaron dos muestras del fluido exo-endocervical a 95 pacientes durante julio 2015 a febrero de 2016 en Maracay Edo. Aragua. Primero, se tomó una muestra con hisopo estéril y seguidamente, otra por lavado con solución fisiológica. Se aisló ADN para detectar virus de papiloma humano mediante Reacción en cadena de la polimerasa; los resultados se analizaron estadísticamente.

Resultados: Las concentraciones y calidad del ADN fueron mayores en las muestras tomadas por lavado que por hisopado. Se evidenció que solo con hisopos hubo extracción de ADN de bajísima calidad en 6,3 % de las muestras. El método de lavado detectó más muestras positivas de virus de papiloma humano que por hisopado.

Conclusión: El método de lavado es el más apropiado para extraer ADN en alta calidad y cantidad, el cual permite un diagnóstico eficiente de virus de papiloma humano.

Palabras Clave: Toma de muestra, Fluido exo-endocervical, Virus de papiloma humano, Reacción en cadena de polimerasa.

SUMMARY

Objective: To compare two methods of collection of exo-endocervical fluid samples in the molecular detection of human papillomavirus infections.

Methods: Two samples of the exo-endocervical fluid were taken to 95 patients during July 2015 to February 2016 in Maracay Edo. Aragua. First sample was taken with sterile swab and then another by lavage with physiological solution. DNA was isolated to detect HPV by polymerase chain reaction and the results were analyzed statistically.

Results: The concentrations and quality of DNA were higher in samples by lavage than by swabbing. It was evidenced that extraction of very low-quality DNA occurs only with swabs in 6.3% of the samples. The lavage method detected more human papillomavirus infections positive samples than the swabbing one.

Conclusion: The lavage method was most appropriate for extracting high quality and quantity DNA suitable for efficient human papillomavirus infections detection.

Keywords: Sample collection, Exo-endocervical fluid, Human papillomavirus infections, Polymerase chain reaction

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer: IARC), en su reporte GLOBOCAN 2012, había un estimado de 528 000 casos de cáncer (Ca) de cuello uterino para el año 2012, con una proyección de 266 000 casos mortales por lo cual ocupa el cuarto lugar entre los cánceres femeninos (1). La mayoría de los casos (cerca de 85 %) se presentarían en las naciones menos desarrolladas, ubicadas en África,

¹Especialista en Obstetricia y Ginecología, Hospital Central de Maracay, Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua-Universidad de Carabobo (FCSSA-UC).

² Biólogo, Facultad de Ciencias y Tecnología, Sede Valencia, Universidad de Carabobo. ³ Biólogo, Estudiante de la Maestría de Ciencias Biomédicas (MCB), FCSSA-UC. ⁴ Dr(a). Biología, Profesor(a) Titular FCSSA-UC, Investigador(a) del BIOMED-UC.

*Este estudio fue utilizado como parte del Trabajo de Grado de Fernando González para la obtención del título de Lcdo. Biología en la Universidad de Carabobo
Financiamiento: Proyectos: Prevalencia de infección por VPH, usando métodos moleculares, en mujeres que asisten al programa de prevención y control del cáncer cérvico uterino del Estado Aragua (FONACIT- N° 2012000973) y Proyecto Fortalecimiento de la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Carabobo (FONACIT- N° 2012002328).

Oceanía, Asia y Centro y Sur América. En Venezuela, se ha reportado que el cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública (2) y los diferentes tipos de cáncer cervical tuvieron el primer lugar como causal de muerte por cáncer entre las mujeres para el año 2005 (3). Últimamente, las cifras oficiales de prevalencia y proyección de la mortalidad para este tipo de patología son escasas en el país; sin embargo, según el Informe de la IARC, para el año 2012, se estimaron 4973 nuevos casos con una mortalidad de 1780 mujeres y para el año 2015 la estimación de nuevos casos se incrementó a 5313 (1).

El impacto del Ca de cuello uterino podría ser disminuido en la población femenina mediante un diagnóstico certero y precoz de los factores predisponentes e iniciadores de la patología. Entre estos factores se encuentra el virus del papiloma humano (VPH), el cual se transmite sexualmente y cuyos genotipos más importantes, 16 y 18, están distribuidos con una frecuencia mediana de 25,7 % y una alta de 51,8 % en las lesiones de bajo y alto grado de cérvix, respectivamente (4). El VPH representa un grupo de virus de ADN de más de 100 tipos los cuales se clasifican en alto, bajo o indeterminado riesgo según puedan originar lesiones intraepiteliales que evolucionen en neoplasias o carcinomas (5).

Los estudios realizados en el país reflejan una variación en la prevalencia de la infección por VPH la cual oscila entre 14 %- 40 % (6 - 10). Dicha diferencia puede deberse al método anticonceptivo empleado (anticonceptivos orales o preservativos) ya que se ha reportado que los métodos de barrera (condón) disminuyen el riesgo de infección por VPH (11). Asimismo, hay diferencia en los genotipos de alto riesgo, tanto en la identidad como en la proporción, lo cual indica que el patrón de genotipos que está circulando en el país varía dependiendo de la región.

Ahora bien, el diagnóstico exitoso del VPH de alto riesgo dependerá de un método con alta sensibilidad y especificidad el cual permita ofrecer un tratamiento efectivo que logre impedir, detener y hasta erradicar el avance hacia estadios más agresivos de cáncer. En este sentido, la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) se considera uno de los métodos más importantes que requiere que el ADN a utilizar sea de buena calidad y cantidad (6); para ello, la toma y el procesamiento de una muestra clínica deben ser adecuados.

El objetivo de este trabajo consistió en la comparación de dos métodos de recolección de muestras de fluido cérvico-vaginal (el hisopado tradicional y el lavado vaginal) exo-endocervical en la detección molecular de VPH.

MÉTODOS

La muestra estuvo integrada por pacientes femeninas (n=95) elegidas entre 300 pacientes voluntarias a un llamado público y abierto para un tamizaje de lesiones en el cuello uterino, realizado durante los meses de julio 2015 a febrero de 2016 en el laboratorio clínico CienPlus Salud C.A., ubicado en Maracay Edo. Aragua. Las pacientes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso” de la Universidad de Carabobo (CB-BIOMED-UC). Las muestras por duplicado fueron tomadas por un solo ginecólogo en un mismo procedimiento. Primero, se tomó una muestra convencional de hisopado vaginal y se preservó en un vial de vidrio con tapa de goma hermética, en solución salina al 0,9 %, (muestra de hisopo). Seguidamente, se tomó otra muestra por lavado exo-endo cervical. Para ello, se utilizó una jeringa de 10 cc y previa colocación del espéculo se roció el cuello con 3 cc de solución fisiológica al 0,9 %, luego se recogió con la misma jeringa en la valva inferior del espéculo para luego emplear un aplicador de algodón con el fin de alcanzar el fondo de saco vaginal y el canal cervical. La solución recolectada junto al aplicador se colocó en un tubo de vidrio el cual se refrigeró a 4 °C (muestra de lavado). Todas las muestras fueron trasladadas en hielo desde CienPlus Salud C.A. al BIOMED, para la detección molecular de VPH.

Procedimiento

Las muestras obtenidas se procesaron para extraer el ADN siguiendo el método modificado de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (12). La cuantificación se realizó mediante mediciones espectrofotométricas a 260 nm, la calidad en cuanto a pureza de contaminantes proteicos se determinó por la relación de absorbancia 260 nm/280 nm y la integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

La presencia de VPH fue detectada mediante un ensayo de reacción en cadena de polimerasa (PCR), en un

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA TOMA DE MUESTRA DE FLUIDO EXO-ENDOCERVICAL
PARA DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

volumen final de 25 µL según protocolo previamente optimizado en el laboratorio (6). Como control positivo se empleó VPH 18, identificado en el BIOMED. En todos los ensayos se amplificó una secuencia del gen del antígeno leucocitario humano (HLA) como control interno. El producto de PCR se refrigeró a 4°C hasta su posterior utilización. La positividad del ensayo se consideró en función de la presencia de una secuencia con un tamaño de 450 pb, correspondiente a una región altamente conservada del gen L1 viral.

Análisis de la información

Con el fin de realizar el análisis estadístico se elaboró una base de datos en formato .xls, de Microsoft Excel®, que posteriormente se exportó al paquete estadístico IBM SPSS Statistics® versión 23.0.0.0 para Windows® y OpenEpi® para Windows®. Utilizando esta herramienta se evaluó la eficiencia de los dos métodos en la obtención de ADN con la prueba estadística de Wilcoxon-Mann-Whitney y para evaluar cuál método permite una mejor detección de infecciones de VPH, minimizando la aparición de falsos negativos, se recurrió a la prueba de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Se constituyeron dos grupos de 95 muestras los cuales representaron al grupo de lavado y al grupo de hisopado y se determinó para cada muestra de cada grupo la concentración de ADN. La tabla 1 reporta los valores de

las concentraciones de ADN los cuales se agruparon de acuerdo a diferentes rangos. Se puede observar que el número de muestras por intervalo fue variable para los dos grupos; sin embargo, en el lavado exo-endocervical la distribución de los valores de las concentraciones de ADN fue más homogénea ya que en el hisopado, el 61% de las muestras tuvo una concentración que osciló entre 0 – 100 ng/µL. También, se observó que los valores de las concentraciones de ADN son mayores en las muestras obtenidas por lavado que por hisopado y estos resultados son estadísticamente significativos (p =0,0055).

La determinación de la calidad del ADN para los dos grupos de muestras mediante la relación de absorbancia a las longitudes de onda 260/280 nm, se presenta en la tabla 2. Se observa que en el procedimiento del hisopado se produjo un mayor porcentaje de muestras con A260/280 > 2 que en el del lavado (~ 5 veces más: 5,3 % / 1,1 %). De la misma manera, se obtuvo más ADN (2,3 veces más) de óptima y buena calidad (A260/280 entre 1,7-<2) en las muestras obtenidas con lavado (22,1 %) que en las del hisopado (9,5 %). La distribución de las muestras en los otros rangos <1,7-1,5 y <1,5-1,1 fue similar con ambos métodos. Sin embargo, se evidenció que solo con el uso de hisopos hubo extracción de ADN de bajísima calidad (A260/280 <1,1) en un 6,3 % de las muestras. Todos estos resultados tienen significancia estadística (p <0,05).

Tabla 1
Determinación de la concentración de ADN por ambos métodos.

Lavado exo-endocervical		Hisopado convencional	
Intervalo de concentración de ADN (ng/µL)	Nºde muestras por intervalo (%)	Intervalo de concentración de ADN (ng/µL)	Nºde muestras por intervalo (%)
16 - 80	17 (17,9)	0 – 100	58 (61)
114 - 170	21 (22,1)	101 – 200	17 (17,9)
171 – 495	25 (26,3)	201 – 479	15 (15,8)
524 - 779	14 (14,7)	620 – 1190	5 (5,2)
800 – 1420	18 (18,9)	-	-

p =0,0055

Tabla 2
Calidad del ADN medido por A260/280

Rango de A260/280	Lavado		Hisopado	
	N° de muestras	%	N° de muestras	%
>2	1	1,1	5	5,3
2-1,7	21	22,1	9	9,5
<1,7-1,5	36	37,9	39	41,1
<1,5-1,1	37	38,9	36	37,9
<1,1-0	0	0	6	6,3

p=0,001

Las frecuencias obtenidas para la detección molecular de VPH se compararon entre ambos grupos de muestras (Tabla 3). Los resultados se presentan con los símbolos “+ y -” para indicar positivo o negativo para VPH. Se observa que el método de lavado detectó más muestras positivas que el del hisopado y este resultado fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabla 3
Relación de las frecuencias de ambas muestras con VPH

Método	Hisopado +	Hisopado -	Total
Lavado +	14	8	22
Lavado -	4	69	73
Total	18	77	95

p=0,03

DISCUSIÓN

La comparación del método de lavado con el convencional para la toma de muestra de fluido exo-endocervical, con el propósito de determinar presencia de VPH, representa el primer reporte realizado en Venezuela. Globalmente, existen estudios que comparan la toma de muestra de fluido cérvico vaginal para realizar la prueba citológica de la forma convencional, en la cual las células son extendidas directamente sobre una lámina, con respecto a la transferencia de las células a un medio líquido (13-15). En este caso no se trata de lavado vaginal sino de dispersión de células atrapadas

en el hisopo o cepillo antes de aplicar la prueba de Papanicolaou; dicha dispersión no evita resultados contradictorios.

Adicionalmente, esta comparación de ambos métodos de toma de muestra, se realizó en una misma paciente de forma secuencial, lo cual presenta la ventaja de uniformidad en cuanto al tiempo de colecta, el personal médico, los materiales y reactivos utilizados y los laboratorios involucrados, entre otros factores.

En este trabajo se evidenció la obtención de mayor cantidad de ADN por el lavado adicional del exo-endocérvix, lo cual significa que este método facilita la recolección y, probablemente, el desprendimiento de células que origina mayor fuente de ADN lo cual es uno de los requisitos para que en el procedimiento de extracción de esta macromolécula, se obtenga puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la PCR (16).

Por otra parte, la calidad del ADN de las muestras obtenidas por lavado es superior al del método de hisopado porque un ADN de alta calidad debe tener una relación A260/280 entre 1,7- <2 y el método de lavado tiene 2,3 veces más ADN en ese rango de absorbancia (16). Asimismo, cuando la relación A260/280 es > 2 significa que hay contaminación considerable de ARN en la muestra; esta contaminación se presentó en un 5,3 % de las muestras de hisopados en comparación con un 1,1 % del otro método. En este caso, habría que añadir un paso más de purificación para eliminar el ARN contaminante y así obtener una respuesta más confiable lo cual encarece y enlentece el proceso. Por el contrario, cuando la relación de A260/280 es muy baja (<1,1) significa que las muestras están contaminadas por proteínas o fenoles y esta situación se evidenció solamente en las muestras por hisopado en un 6,3 %. A estas muestras también habría que hacerle un tratamiento para eliminar los contaminantes o tomar de nuevo la muestra en estas pacientes con la consiguiente pérdida de tiempo, recursos y molestia para las pacientes.

Un ADN de buena calidad permite realizar diagnósticos moleculares más precisos y disminuir los falsos negativos. Esto se demostró, con una probabilidad bastante significativa, cuando se compararon los resultados del lavado exo-endocervical con respecto

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA TOMA DE MUESTRA DE FLUIDO EXO-ENDOCERVICAL PARA DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

al hisopado convencional ya que, utilizando el método del lavado exo-endocervical, la detección de muestras positivas a VPH incrementó.

En conclusión, utilizando el método de lavado exo-endocervical para la obtención de muestras, se obtiene mayor cantidad y calidad de ADN lo cual permite una mayor precisión en el diagnóstico de VPH y por lo tanto, en la prevención y diagnóstico, en sus primeras etapas, del cáncer cervicouterino.

AGRADECIMIENTO

A las pacientes por su valiosa colaboración en la obtención de las muestras. A la MSc. Yda Méndez por la colaboración en parte del procesamiento de algunas muestras en el laboratorio.

REFERENCIAS

1. IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. [Revisado 25-11-2016]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. Correnti M, Cavazza M, Alfonso B, Lozada C. La Infección por el Virus de Papiloma Humano: un problema de salud pública en Venezuela. VITAE Academia Biomédica Digital 2002 [Revisado 26-11-2016] (13). Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3575.pdf
3. Capote Negrin L. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. Rev Venez Oncol. 2006;18 (4): 269-281.
4. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 15 December 2016. [Revisado 7-01-2017]. Disponible en: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
5. Cruz J, Márquez L, Quintero M, Bastidas M., Puig Pons J. Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo 16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11. Rev Obstet Ginecol Venez. 2013; 73 (3):187-194.
6. Aguiar H, Goñi N, Pinto L, Carozza M, Abou Orm S, Correia H et al. Asociación entre presencia del virus del papiloma humano y hallazgos anatómo-patológicos Rev Obstet Ginecol Venez. 2015; 75 (3): 164-171.
7. Reigosa A, Alvarez M, De Vasconcelo M, Cristin R, Salas W, Rebolledo V, et al. Diagnóstico del virus papiloma humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica. Salus. 2004; 8 (1): 33-42.
8. Contreras L, Correnti M, Avila M, Guerrero A, León A. Virus del papiloma humano (VPH) en contexto ecológico venezolano. (I): diagnóstico citológico y molecular. Salus. 2008; 12 (3): 68-77.
9. Somogyi L, Malpica C, Alvarado B, García M. Virus del papiloma humano (VPH) detección y tipificación en la consulta privada. Rev Obstet Ginecol Venez. 2010; 70 (3): 160-166.
10. Sanoja LM. Detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de polimerasa, en muestras cervicales de estudiantes. Universidad de Carabobo. Venezuela. Cnud Salud. 2013; 11: 1-10.
11. Winer RL, Hughes J, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat N, Holmes K, et al. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. N Engl J Med. 2006; 354 (25): 2645-2654
12. Rivero J, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Urdaneta L, Herrera F. DNA degradation of Anopheles darlingi collected at high relative humidity and preserved in isopropanol. Bol Malariol Sal Amb. 2007; 47 (1): 149-151.
13. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2008; 111 (1): 167-177.
14. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. Lancet. 2006; 367 (9505): 122-132.
15. Batista S, Ramos D, Talamonte V, Gazi U, Coelho R. Comparative study of the results from conventional cervico-vaginal oncotoc cytology and liquid-based cytology. Einstein. 2012; 10 (4): 466-472.
16. Green M, Sambrook J. Isolation and Quantification of DNA. En: Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 1 (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. p.1-78.