

# Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales

Jesús Chacón<sup>a</sup>, Iziar Sanz<sup>b</sup>, María Dolores Rubio<sup>c</sup>, María Luisa de la Morena<sup>c</sup>, Esperanza Díaz<sup>c</sup>, María Luisa Mateos<sup>a</sup> y Fernando Baquero<sup>a</sup>

Servicios de <sup>a</sup>Microbiología, <sup>b</sup>Anatomía Patológica y <sup>c</sup>Ginecología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España.

**INTRODUCCIÓN.** El objetivo del presente estudio es utilizando dos técnicas complementarias de detección del virus del papiloma humano (VPH) (captura de híbridos [CH] y reacción en cadena de la polimerasa [PCR]), relacionar el estudio citológico y/o la biopsia de cérvix con la presencia de distintos genotipos del VPH, para conocer la influencia de éstos en la producción de lesiones precancerosas y cáncer cervical, así como relacionar la carga viral con la presencia de VPH-AR (alto riesgo) determinados por PCR. **MÉTODOS.** Se han estudiado 272 mujeres que presentaban la mayoría alteraciones celulares compatibles con lesiones cervicales por el VPH. En todas se ha detectado VPH de alto riesgo por el método de CH y se realizó estudio histológico y detección del genotipo del VPH por técnica de PCR.

**RESULTADOS.** En el 22,06% de las pacientes no se detectó ADN de VPH con la técnica de PCR. El genotipo 16 y/o 18 fue el prevalente y se encontró en el 33% de las 212 mujeres estudiadas. Se hallaron infecciones mixtas por varios genotipos en el 25% de estas 212 pacientes. En cuanto a las lesiones histológicas encontradas, en 61 pacientes con lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (H-SIL) y cáncer, el 55,73% presentaban genotipos 16 y/o 18, mientras que en 38 pacientes con presencia de células escamosas alteradas de significado incierto (ASCUS) y en 126 con lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (L-SIL), se pusieron de manifiesto estos genotipos únicamente en el 7,9 y 22,2%, respectivamente, estableciéndose una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). El 12,13% de las 272 pacientes tenían una carga viral inferior a 3 pg/ml. En las que tenían una carga viral de VPH > 3 pg/ml, se encontró VPH-AR en el 77,40% de éstas, siendo esta relación significativa ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSIONES.** En las pacientes con biopsia de H-SIL hemos encontrado mayoritariamente la presencia de los genotipos 16 y/o 18. La técnica de CH es útil como procedimiento de cribado. La técnica de PCR es interesante para identificar los genotipos 16 y 18. Es conveniente que los resultados de los tests de detección del VPH se interpreten conjuntamente con los de biopsia y citología.

**Palabras clave:** Virus del papiloma humano de alto riesgo. Lesiones cervicales. Captura de híbridos. PCR. VPH-AR.

Detection and genotyping of high-risk human papillomavirus in cervical specimens

**INTRODUCTION.** This study investigates the relationship between various human papillomavirus (HPV) genotypes and the results of cytological and histological analysis of cervical samples using two complementary assays for HPV detection (hybrid capture and PCR). We studied the impact of HPV genotype on the presence of pre-cancerous cervical lesions and cervical cancer, as well as the association between HPV viral load and the presence of high-risk HPV as determined by PCR.

**METHODS.** A total of 272 women were studied. Most of them presented cellular alterations consistent with cervical lesions due to HPV and all had high-risk HPV as detected by hybrid capture testing. Histological studies were undertaken, and HPV genotyping by PCR based on microarrays was performed.

**RESULTS.** HPV-DNA was not detected or genotypes could not be identified by PCR in 22.06% of the patients. Genotype 16 and/or 18 was detected in 33% of 212 patients. Mixed infections with several genotypes were found in 25% of patients. The histological lesions associated with the various genotypes were as follows: genotype 16 and/or 18. were detected in 55.73% of the 61 patients with H-SIL and cancer, whereas these genotypes were detected in only 7.9% and 22% of women with ASCUS and L-SIL ( $P < 0.05$ ). Viral load was less than 3 pg/mL in 12.13% of the women studied. In this group of patients, high-risk HPV was present in 39.39%. In the group of patients who had a viral load greater than 3 pg/mL, high risk-HPV was detected in 77.4% ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS.** Genotypes 16 and/or 18 were detected in most patients with a diagnosis of H-SIL. Other high-risk-HPV genotypes were much less prevalent. Hybrid capture testing is a useful screening test. PCR was effective for identifying genotypes 16 and 18. Histological and cytological findings in cervical samples should be interpreted together with high-risk HPV detection.

**Key words:** High risk human papillomavirus. Cervical lesions. Hybrid capture. High-risk HPV. PCR.

Correspondencia: Dr. J. Chacón.  
Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal.  
Ctra. Colmenar, km 9,1. 28034 Madrid. España.  
Correo electrónico: jchacon.hrc@salud.madrid.org

## Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) es la causa de un amplio número de situaciones patológicas, tanto en el varón como en la mujer, siendo las más frecuentes los condilomas acuminados o verrugas genitales.

Durante muchos años se han considerado estos condilomas como una patología de escasa relevancia clínica, pero varios estudios que se iniciaron a partir de 1980 han establecido la asociación del VPH con diversos procesos malignos neoplásicos del área genitourinaria y especialmente con aquellos que se localizan en el cérvix uterino.

Hasta este momento se han aislado unos 100 genotipos, de los que aproximadamente 42 se han localizado en el área genital. Según su asociación con el cáncer de cérvix se han agrupado en dos categorías: de alto riesgo oncogénico y de bajo riesgo oncogénico<sup>1</sup>.

En las lesiones en las que se localiza VPH de bajo riesgo (VPH-BR), éste se encuentra en forma episómica, aislado del genoma celular. Los VPH de alto riesgo (VPH-AR) por el contrario, se encuentran integrados en el genoma de la célula huésped o de las células neoplásicas. Éstas expresan las oncoproteínas E6 y E7 (región E, expresión temprana y los genes 6 y 7 que codifican las proteínas implicadas en los procesos de replicación, transcripción y transformación celular).

La prevalencia del VPH puede variar mucho según las poblaciones. En un estudio epidemiológico realizado en varios países del mundo, con representación de todos los continentes, en mujeres con citología normal, se encontró una prevalencia muy amplia, siendo los valores mínimos en España (1,4%) y los más altos en Nigeria (25,6%)<sup>2</sup>.

Por estudios ya realizados, se ha estimado que aproximadamente del 3 al 10% de las mujeres infectadas tendrán una infección persistente a lo largo de los años<sup>3</sup>; estas son las que constituyen el grupo de alto riesgo para progresión hacia el cáncer cervical.

El estudio del genotipo de VPH que infecta el cérvix es importante por varios motivos, pero principalmente por sus implicaciones pronósticas. Es necesario distinguir los de alto riesgo oncogénico de los de bajo riesgo, por su valor pronóstico en la prevención del cáncer de cérvix. Así mismo, el genotipado del VPH es necesario para estudios epidemiológicos y diagnóstico de las infecciones por VPH en pacientes individuales y en poblaciones, pues del genotipo van a depender factores tan importantes como la gravedad de la infección, los individuos más expuestos o el área de distribución geográfica.

La citología o técnica de Papanicolaou utilizada habitualmente como cribaje para prevenir el cáncer de cérvix tiene una sensibilidad limitada para detectar lesiones precancerosas, además de otros inconvenientes como el posible diagnóstico erróneo si se considera únicamente el resultado de la citología. Según algunos autores la utilización de técnicas de biología molecular puede aumentar la sensibilidad de la detección sistemática de las lesiones precancerosas hasta cerca del 100% para las lesiones de alto grado<sup>4</sup>.

También es importante detectar la presencia de VPH-AR en muestras cervicales con lesiones de presencia de células escamosas alteradas de significado incierto (ASCUS) y lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (L-SIL) pues éstas pueden evolucionar a lesiones escamosas intra-

epiteliales de alto grado (H-SIL)/cáncer, o bien remitir espontáneamente sin ningún tratamiento.

Por los trabajos recientes de Bosch et al<sup>5</sup>, se conocen los distintos genotipos del VPH. Un total de 15 fueron clasificados en tipos de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82); 3 de probable alto riesgo oncogénico (26, 53 y 66), y 12 de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108).

El desarrollo de pruebas de biología molecular que detectan VPH y específicamente VPH-AR, debido a su alta sensibilidad, tienen un alto valor en programas de cribado de prevención del cáncer cervical, para seleccionar aquellas mujeres con lesiones histológicas susceptibles de evolucionar a lesiones de alto grado o carcinoma. Estas pruebas unidas a la citología permiten reducir los costes del cribado del cáncer de cuello uterino, y son muy útiles en la prevención del cáncer de cérvix.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que ciertos genotipos de VPH, en concreto el 16 y 18, están implicados en la mayoría de las lesiones precancerosas de alto grado y del cáncer cervical; así mismo, el genotipo 16 es el más frecuente entre los de alto riesgo en todo el mundo, variando su prevalencia en mujeres con citología normal entre el 43,9% en Filipinas hasta el 72,4% en Marruecos; en cuanto al genotipo 18, se encuentra en el 4,4% de las mujeres en Colombia y hasta el 27,9% en Filipinas<sup>6</sup>.

El objetivo del presente estudio es utilizando 2 técnicas complementarias de detección del VPH (captura de híbridos [CH] y reacción en cadena de la polimerasa [PCR]), relacionar el estudio citológico y/o la biopsia de cérvix con la presencia de distintos genotipos del VPH, para conocer la influencia de éstos en la producción de lesiones precancerosas y cáncer cervical, así como relacionar la carga viral con la presencia de VPH-AR determinados por PCR.

## Material y métodos

### Población

Se evaluaron prospectivamente 272 mujeres de edades comprendidas entre los 17 y 76 años de edad, que visitaron las Consultas Externas de Ginecología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, especialmente la consulta de Patología Cervical, entre el mes de enero y el mes de diciembre del año 2005. No había pacientes embarazadas ni infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En todas las pacientes se detectaba VPH-AR mediante CH. Este test es el utilizado como procedimiento de cribado junto con la citología para prevenir el cáncer de cérvix. En la mayoría, el examen citológico del cérvix presentaba alteraciones celulares, y las restantes están incluidas por indicación clínica.

### Examen ginecológico

Se realizaron citologías a todas las pacientes y biopsias a 167 pacientes; si se disponía de biopsia, se consideró únicamente este resultado. Si sólo disponíamos de citología, se tuvo en cuenta el resultado de la misma.

La citología se realizó extendiendo en un portaobjetos 3 muestras: la primera de vagina, la segunda de exocérnix y la tercera de endocérnix. Las muestras se tiñeron con la técnica de Papanicolaou. En las mujeres en las que se observaron zonas de transformación atípicas se realizaron biopsias exocervicales dirigidas colposcópicamente.

Los resultados de la citología cervical y biopsia se clasificaron en 5 categorías diferentes según la terminología de Bethesda<sup>7</sup>:

1. Sin alteraciones: negativa para lesión intraepitelial o malignidad.

2. ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto.
3. SIL bajo grado (L-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado.
4. SIL alto grado (H-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.
5. Carcinoma.

En las pacientes en las que se describieron resultados histológicos no coincidentes se consideraron válidos los resultados de la biopsia.

### Detección de VPH

Se extrajeron a cada paciente el mismo día 2 muestras de células cervicales: una en cepillo cervical y otra en torunda seca. A determinadas pacientes sólo se las pudo realizar la toma en cepillo cervical. La detección del VPH mediante el método de CH se realizó a partir de las muestras recibidas en cepillo cervical (Digene Cervical Sampler). La detección mediante el método Clinical Arrays se realizó en muestras recibidas en torunda seca (Genómica, SA) y si no se disponía de ellas, a partir de las recibidas en cepillo cervical.

La detección del ADN del VPH-AR se realizó mediante el test Híbrido Capture II® (DIGENE, Gaithersburg, USA). Esta prueba detecta con una sonda la presencia de VPH-AR (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y con otra, la presencia de VPH de bajo riesgo (VPH-BR) (tipos 6, 11, 42, 43 y 44). La señal de amplificación está basada en la producción de híbridos de ADN/ARN analizados por quimioluminiscencia. Los resultados se expresan con el cociente RLU/CO (RLU: unidad relativa de luz; CO: valor límite). La prueba se consideró positiva, cuando las RLU fueron iguales o mayores que la media de tres controles internos, equivalente a 1 pg/ml de ADN de VPH (RLU/CO ≥ 1). La intensidad lumínica emitida por la muestra positiva es directamente proporcional a la cantidad de ADN de VPH presente en la muestra, considerándose como una estimación semicuantitativa de la carga viral de las muestras. La técnica se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se realizó la PCR Clinical Arrays® (Genómica SA, España) para conocer el genotipo presente. Esta técnica está basada en un sistema de microarrays que detecta infecciones únicas o múltiples por 35 tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85, 89).

La extracción del ADN se realizó mediante el procedimiento comercial CA-LINUS 24, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó un fragmento de 450 pb de la región L1 del VPH en un termociclador Perkin Elmer 9600. La detección del amplificado se llevó a cabo utilizando un microarray de baja densidad el array en tubo.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS V.12.0. La edad se expresó en su media y rango. La asociación entre las variables se realizó mediante tablas de contingencia, utilizando la prueba de chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) o el test exacto de Fisher, en la cuantificación de la carga viral por CH. La evaluación de las tendencias se realizó con la prueba de la  $\chi^2$  de tendencia lineal. En el estudio, el nivel de significación estadística que se estableció fue con valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados

La edad de las pacientes que participaron en el ensayo está comprendida entre los 17 y 76 años, no habiendo diferencias significativas según el resultado de la biopsia/citología, excepto en las 3 mujeres con resultado de carcinoma en la biopsia, las cuales tenían 57, 38 y 50 años, respectivamente (tabla 1).

Los resultados de la citología o biopsia de las 272 pacientes estudiadas son los siguientes: *a*) en 47 pacientes, el

estudio histológico o la citología fueron negativos para lesión intraepitelial o malignidad; *b*) en 126 pacientes, se obtuvo un diagnóstico histológico de L-SIL; *c*) en 58 pacientes cuya biopsia fue de H-SIL hubo correlación citológica en un 67,2% de los casos; los restantes fueron diagnosticados en citología como SIL no filiado, de bajo grado o ASCUS, y *d*) en 38 mujeres con diagnósticos citológicos de ASCUS no se demostró lesión histológica.

En 60 pacientes (22,06%) de las 272 estudiadas no se detectó ADN con la técnica de PCR, se obtuvieron resultados no concluyentes o no se caracterizó bien el genotipo de VPH. En las 212 restantes (77,94%) se detectaron uno o más genotipos de VPH de alto o bajo riesgo. En 54 de estas pacientes (25,47%) se encontró una infección mixta por varios genotipos. La distribución de genotipos de alto riesgo encontrados es la siguiente:

En 59 muestras se detectó el genotipo 16, en 26 muestras el 66, en 25 muestras el 58, en 24 muestras el 53, en 20 muestras el 31, en 15 muestras el 51, en 15 muestras el 33, en 13 muestras el 18, en 7 muestras el 82, en 6 muestras el 52, en 6 muestras el 56, en 5 muestras el 39, en 4 muestras el 45, en 3 muestras el 68, en 2 muestras el 35, en 2 muestras el 59, en una muestra el 73, y en una muestra el 26.

Es de destacar que únicamente en 41 muestras se detectó VPH-BR.

En 70 (33,02%) de estas 212 pacientes se encontró el genotipo 16, 18 o ambos, estableciéndose una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), con la presencia de lesiones L-SIL y H-SIL en la biopsia o citología (tabla 2).

Así mismo, se encontró una relación estadísticamente significativa si además de los genotipos 16 y 18 se incluyen otros genotipos de alto o probable alto riesgo. Si considera-

TABLA 1. Intervalos de edades de las 272 pacientes según los resultados de la biopsia/citología

Biopsia/citología	Mediana	Mínimo	Máximo
Sin alteraciones	33	18	75
ASCUS	34	19	76
L-SIL	32	17	70
H-SIL	38	19	72
Cáncer	50	38	57

ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado; H-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.

TABLA 2. Relación de la detección del virus del papiloma humano 16 y/o 18 en función del diagnóstico histológico en las 272 pacientes estudiadas

Biopsia/citología	VPH 16 y/o 18		Total (%)
	Ausencia (%)	Presencia (%)	
Sin alteraciones	42 (20,8)	5 (7,1)	47 (17,3)
ASCUS	35 (17,3)	3 (4,3)	38 (14,0)
L-SIL	98 (48,5)	28 (40,0)	126 (46,3)
H-SIL	27 (13,4)	31 (44,3)	58 (21,3)
Cáncer	0 (0,0)	3 (4,3)	3 (1,1)
Total pacientes	202 (100,0)	70 (100,0)	272 (100,0)

$p < 0,05$ .

VPH: virus del papiloma humano; ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado; H-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.



**TABLA 3. Relación de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo en función del diagnóstico histológico en las 272 pacientes estudiadas**

Biopsia/citología	VPH-AR		Total (%)
	Ausencia (%)	Presencia (%)	
Sin alteraciones	21 (28,4)	26 (13,1)	47 (17,3)
ASCUS	19 (25,7)	19 (9,6)	38 (14,0)
L-SIL	27 (36,5)	99 (50,0)	126 (46,3)
H-SIL	7 (9,5)	51 (25,8)	58 (21,3)
Cáncer	0 (0,0)	3 (1,5)	3 (1,1)
Total pacientes	74 (100,0)	198 (100,0)	272 (100,0)

VPH-AR: tipos 16 y 18 y otros tipos de alto y probable alto riesgo.  $p < 0,05$ . VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo; ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado; H-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.

**TABLA 4. Relación de la detección del virus del papiloma humano de bajo riesgo en función del diagnóstico histológico en las 272 pacientes estudiadas**

Biopsia/citología	VPH-BR		Total (%)
	Ausencia (%)	Presencia (%)	
Sin alteraciones	37 (16,0)	10 (24,4)	47 (17,3)
ASCUS	33 (14,3)	5 (12,2)	38 (14,0)
L-SIL	106 (45,9)	20 (48,8)	126 (46,3)
H-SIL	52 (22,5)	6 (14,6)	58 (21,3)
Cáncer	3 (1,3)	0 (0,0)	3 (1,1)
Total pacientes	231 (100,0)	41 (100,0)	272 (100,0)

$p = 0,536 > 0,05$ .

VPH-BR: virus del papiloma humano de bajo riesgo; ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto; L-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado; H-SIL: lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.

**TABLA 5. Cuantificación de la carga viral del virus del papiloma humano de alto riesgo por captura de híbridos en relación con la presencia del virus del papiloma humano de alto riesgo por PCR**

Carga viral de VPH	VPH-AR		Total (%)
	Ausencia (%)	Presencia (%)	
RLU/CO < 3 pg/ml	20 (27,0)	13 (6,6)	33 (12,1)
RLU/CO > 3 pg/ml	54 (73,0)	185 (93,4)	239 (87,9)
Total pacientes	74 (100,0)	198 (100,0)	272 (100,0)

$p < 0,05$ .

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; VPH-AR: virus del papiloma humano de alto riesgo; RLU/CO: unidad relativa de luz/valor límite.

mos globalmente los genotipos de alto riesgo incluidos, el 16 y el 18 encontrados en 198 pacientes, la relación con las lesiones L-SIL y H-SIL es estadísticamente significativa.  $\chi^2$  de Pearson  $p < 0,05$  (tabla 3).

Sin embargo, no se encontró relación estadísticamente significativa, como era de esperar, en las 41 pacientes en las que se detectaron genotipos de bajo riesgo, de forma única o múltiple con otros genotipos de alto o bajo riesgo,  $p = 0,536 > 0,05$  (tabla 4).

En las 272 pacientes con VPH-AR detectado por CH, las lecturas de carga viral de las muestras estuvieron comprendidas entre 1 y 3.081 pg/ml. Un total de 33 de las 272 muestras (12,1%) tuvieron menos de 3 pg/ml, y el resto, 239 muestras (87,9%) tuvieron más de 3 pg/ml.

La cuantificación de la carga viral del VPH-AR por CH dio como resultado que de las 239 muestras con RLU/CO > 3 pg/ml, en 185 (77,41%) se detectó ADN de VPH-AR por la técnica de PCR, mientras que en 33 muestras con RLU/CO < 3 pg/ml, solamente en 13 (39,39%) se detectó ADN de VPH-AR,  $p < 0,05$  (tabla 5).

## Discusión

Se ha comprobado por diversos autores que la infección por el VPH está asociada al desarrollo de lesiones precursoras de cáncer cervical, así como a diversos tipos de cáncer de cuello uterino<sup>8</sup>. Sin embargo, para que se desarrollen las lesiones precancerosas es imprescindible que la infección sea persistente y que el genotipo infectante sea de alto riesgo<sup>9</sup>.

Según Wright et al<sup>10</sup>, el genotipo 16 es el más frecuente en las mujeres con CIN II y CIN III encontrándose en más del 50% de las mujeres estudiadas. En un estudio precedente realizado en nuestro hospital, también se encontró que el genotipo 16 fue el más prevalente en mujeres con resultados citológicos alterados<sup>11</sup>. De acuerdo con estos datos en el presente estudio, realizado en su inmensa mayoría a partir de datos recogidos de las pacientes que visitaron las Consultas de Patología Cervical del Hospital Ramón y Cajal en el año 2005, los genotipos 16 y/o 18 se encontraron en 34 (55,73%) de 61 pacientes con H-SIL y cáncer, mientras que sólo se encontró en 3 (7,9%) de 38 mujeres con ASCUS y en 28 (22,2%) de 126 con L-SIL. Existe una clara relación de los genotipos 16 y/o 18 de VPH con las lesiones H-SIL y cáncer. Sin embargo, si se considera el resto de los genotipos de VPH-AR, la relación con estas lesiones es menos manifiesta. En 61 pacientes con H-SIL y cáncer, 54 estaban infectadas por VPH-AR (88,52%); esto es del todo previsible, pues como se ha puesto de manifiesto, en casi todos los casos de H-SIL o cáncer están implicados VPH-AR. En las 7 pacientes restantes no se encontró ADN de VPH-AR, pudiéndose explicar por las limitaciones en el procedimiento o deficiente calidad de las muestras. En 38 pacientes con ASCUS y en 126 con L-SIL detectamos VPH-AR en 19 (50%) y 99 pacientes (78,6%), respectivamente. Esto era también previsible, pues en el cribado previo con el método de CH, todas estas pacientes tenían presumiblemente VPH-AR, destacando que únicamente en el 50% de pacientes con ASCUS se pusieron claramente de manifiesto los VPH-AR, pero lo que es más significativo en nuestro estudio es que en estas pacientes predominan VPH-AR diferentes al 16 y 18, sugiriendo que éstos incrementan la severidad de las lesiones cervicales y su progresión a CIN II y CIN III como han puesto también en consideración otros autores<sup>12</sup>. Así mismo, el diferente riesgo para producir lesiones cervicales precancerosas de los distintos genotipos de VPH-AR, implica un potencial oncogénico diferente. Por esto es de especial importancia el identificar los genotipos 16 y 18 para el manejo más adecuado de estas pacientes<sup>13</sup>. En nuestro estudio, en las únicas 3 mujeres con carcinoma, uno escamoso microinvasivo y dos adenocarcinomas de cérvix, estaban implicados los genotipos 16 y 18, coincidiendo estos datos con los publicados por otros autores<sup>14</sup>.

La conclusión más importante de nuestro estudio, es la presencia mayoritaria en las pacientes con resultados en

la biopsia de H-SIL de los genotipos 16 y/o 18 (31 sobre 58 muestras), representando el 53,45% de todas estas muestras; el resto de los genotipos de alto riesgo encontrados en estas pacientes, estaban presentes en muy escaso número; así el genotipo 33 se encontró únicamente en 5 pacientes y el genotipo 58, en cuatro; el resto de genotipos estaba presente solamente en tres o menos pacientes. Así mismo, teniendo en cuenta la distribución de edades de las pacientes, creemos que la anterior conclusión sería también válida para las pacientes de edades menores a 35 años.

Se ha relacionado la presencia de determinados genotipos con el estado inmunitario de la paciente. Según algunos autores, el VPH 16 está menos influenciado por este estado que otros genotipos de VPH. En pacientes con deficiente estado inmunitario, debido a inflamaciones cervicales crónicas, infecciones parasitarias, malnutrición o VIH, diferentes tipos de VPH-AR aumentan el riesgo de producir lesiones<sup>15</sup>. Entre nuestras pacientes no había embarazadas ni infectadas por el VIH, por lo que se pueden excluir estos factores de riesgo específicos, no teniendo conocimiento de ninguna patología que pudiera causar inmunosupresión en las pacientes estudiadas.

Respecto a las técnicas utilizadas para la detección del VPH, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado únicamente la técnica de CH como procedimiento más adecuado para el cribado en mujeres de 30 o más años de forma conjunta con la citología<sup>16</sup>. Aunque la CH es muy sensible, depende del contenido celular de las muestras, obteniéndose ocasionalmente falsos positivos con lecturas bajas de RLU/CO. También se pueden encontrar ocasionalmente falsos negativos y contaminaciones cruzadas entre tipos de alto y bajo riesgo<sup>17</sup>. En nuestro estudio hemos hallado un 25% de infecciones mixtas, y probablemente este porcentaje sea mayor, pues en la lectura visual automática del genotipo por el procedimiento Clinical Arrays, se toma como referencia el de mayor lectura óptica, infravalorándose los siguientes. Por otra parte al haber hecho cribado previo a las muestras con la técnica de CH, no podemos determinar aquellas en las que hubiéramos hallado VPH con la técnica de Clinical Arrays. Algunos autores, han señalado que la valoración de la carga viral en las muestras con VPH-AR debe realizarse con gran cautela, pues no existen procedimientos estandarizados para cuantificarla con exactitud<sup>18</sup>, además no puede corregirse en función del número de células existentes en la muestra<sup>19</sup>. También la detección de cargas virales altas puede ser resultado de infecciones con participación de varios genotipos<sup>20</sup>.

En nuestro estudio, se obtuvieron resultados de cargas virales superiores a 3 pg/ml con más frecuencia en muestras en las que se detectaron VPH-AR por PCR, sugiriendo que se producen ocasionalmente falsos negativos y contaminaciones cruzadas entre tipos de alto y bajo riesgo con lecturas bajas. Un inconveniente es que los 3 genotipos de "probable" alto riesgo oncogénico citados en el trabajo de Bosch et al<sup>8</sup> el 26, el 53 y el 66, no estén incluidos en las sondas utilizadas en el método de CH, pues su presencia en las muestras estudiadas es bastante frecuente (en nuestra serie, ocupan el segundo y el cuarto lugar en frecuencia). Se desconoce aún si esto puede tener consecuencias clínicas. Es de destacar también que en las 60 pacientes con resultado "no se detectó ADN" con la técnica de

PCR, están incluidas muestras en las cuales la lectura automática del resultado señalaba "no concluyente"; estas muestras no se repitieron, por lo cual es probable que algunas de éstas tuvieran genotipos que no se caracterizaron.

Mediante PCR podemos determinar el genotipo específico del VPH, conocer si la paciente tiene infecciones únicas o múltiples y diferenciar la reinfección de la infección persistente si el genotipo encontrado es distinto. Al identificar a las pacientes que están infectadas con los genotipos 16 y 18 podemos ayudar a predecir el curso biológico de las lesiones infectadas precancerosas y cancerosas con el consiguiente beneficio para la paciente. La baja especificidad de los tests de VPH-AR para pacientes con H-SIL, puede ser compensada con el genotipado específico del 16 y 18 principalmente<sup>13</sup>. Otra ventaja importante del genotipado del VPH es conocer los genotipos prevalentes en los distintos países para su inclusión en la vacuna. Esta técnica también tiene inconvenientes, entre otros, el precio elevado, probabilidad de contaminaciones, resultados a veces no concluyentes, reacciones inhibidas por deficiente calidad de la toma, etc.

Consideramos que el diagnóstico del VPH por CH debe ir unido al conocimiento epidemiológico del VPH en poblaciones y edades, así como a un correcto seguimiento ginecológico y en determinados casos, se debe realizar el genotipado del VPH-AR diagnosticado. Así mismo, conviene tener en cuenta el resultado citohistológico para valorar un resultado positivo o negativo de la detección del VPH por cualquier técnica, pero más especialmente por CH.

Afortunadamente, la estrecha vigilancia, seguimiento y si está indicado, el tratamiento de las pacientes con lesiones cervicales en las que se ha evidenciado un genotipo de alto riesgo y específicamente el 16 y/o 18, incluso en edades tempranas nos permite ser optimistas en la clara disminución en los próximos años, de los casos de lesiones precancerosas y cancerosas asociados a esta patología, unido con el desarrollo actual de una vacuna en la que están incluidos, entre otros, los genotipos 16 y 18 de alto riesgo y el 6 y 11 de bajo riesgo en fase avanzada de experimentación.

#### Agradecimientos

Al Servicio de Estadística del Hospital Ramón y Cajal el apoyo técnico prestado en la realización de las tablas estadísticas.

#### Bibliografía

1. Beutner R, Tyring S. Human papillomavirus and human disease. *An J Med*. 1997;102(5A):9-15.
2. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJDF, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005;9490:991-8.
3. De Francesco MA, Gargyulo F, Schreiber C, Giravolo G, Salinero F, Manca N. Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples from Italian patients. *J Med Vir*. 2005;75:588-92.
4. Belinson J, Qiao YL, Pretorius R, Zhang WH, Elson P, Li L, et al. Province cervical cancer screening study: A cross sectional comparative trial of multiple techniques to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2001;83:439-44.
5. Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:518-27.
6. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;88:63-73.

7. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al, for the Forum Group Members and the Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*. 2002;287:2114-9.
8. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:796-802.
9. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence-implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol*. 2004;73:65-70.
10. Wright TC, Kurman RJ. A critical review of the morphologic classification systems of preinvasive lesions of the cervix. The scientific basis for the paradigm. En: Lacey C, editor. *Papillomavirus reviews: current research on papillomavirus*. London: Leeds University Press; 1994. p. 215-25.
11. Chacón J, Mateos ML, Sanz I, Rubio MD, Baquero F. Genotipos de virus del papiloma humano más frecuentes en mujeres con citología cervicovaginal alterada, utilizando técnicas de captura de híbridos y reacción en cadena de la polimerasa. *Clin Invest Ginecol Obstet*. 2006;33(3):97-101.
12. Hee Jung A, Nam Hoon C, Sun Young L, In Ho K, Chan L, Seung Jo K, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA Chip Microarray method. *Cancer*. 2003; 97:1672-80.
13. Snijders JF, Steenbergen R, Heiderman D, Meijer C. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*. 2006;208:152-64.
14. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:1072-79.
15. Strickler HD, Palefsky JM, Shah KV, Anastos K, Klein RS, Minkoff H, et al. Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1062-71.
16. Wright TC, Shiffman M, Solomon D, Cox JT, García F, Goldie S, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol*. 2004;103:304-9.
17. Yamazaki H, Sasagawa T, Basha W, Segawa T, Inoue M. Hybrid Capture II and LCR-E7 PCR assays for HPV typing in cervical cytologic samples. *Int J Cancer*. 2001;94:222-7.
18. Tena D, Garrido N, Menéndez JM, Delgado JJ, Romanyk J, González MR, et al. Utilidad de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante Hybrid Capture II® en mujeres con citologías anormales de cuello uterino. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:474-8.
19. Clavel C, Masure M, Levert M, Putaud I, Manjeonjean C, Lorenzato M, et al. Human papillomavirus detection by the Hybrid Capture assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9:145-50.
20. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Follen-Mitchell M, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1030-44.