

## Diagnostico del Virus de Papiloma Humano por papanicolau y PCR en un grupo de adolescentes y mujeres jóvenes.

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Centro de Investigación en Reproducción Humana.

Correspondencia del autor: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Centro de Investigación en Reproducción Humana. Avenida Justo Arosemena. Telefono: (507) 507-5639 Fax: (507)507-5822 email: [erichu@gorgas.gob.pa](mailto:erichu@gorgas.gob.pa), [echuv@hotmail.com](mailto:echuv@hotmail.com)

Autores: Chu E., Bratwaite O., Gonzalez I., Campo, Z, De León R. G.

### RESUMEN

#### Objetivos

Determinar la frecuencia de aparición de VPH por PCR y papanicolau, en una población de adolescentes jóvenes y tipificar HPV 16 y HPV 18. Determinar el porcentaje de pacientes no diagnosticados por PAP, desarrollar un protocolo diagnóstico por PCR que utilice poca cantidad de reactivos para maximizar el ensayo.

#### Materiales y Métodos:

Se analizaron 150 muestras de jóvenes de 13 a 24 años usuarias de la Clínica de Anticoncepción del Centro de Investigación Reproducción Humana. Se tomaron muestras de secreción endocervical mediante citobrush. Una parte se le realizó Papanicolau y otra parte se utilizó para el PCR. El ADN fue extraído con el kit de extracción de ADN de Promega. Para el diagnóstico de VPH se utilizaron cebadores consensus MY-009 y MY-011. La tipificación se logró mediante los cebadores HPV1015 y HPV 1016 para el tipo 16 y HPV-1017 y HPV1018 para HPV 18, reactivos Maxim Biotech. La PCR se realizó con MasterMix de Promega.

#### Resultados:

El total de muestras positivas por Virus del Papiloma Humano fue 71 (47.3%). Las muestras positivas por Virus del Papiloma Humano (VPH) por PCR consensus fue de 68 (45.3%) VPH vs solo el 20 (13.3%) con papanicolau. Para el HPV-18 solo se encontraron 4 casos positivos (2.3%) y ninguno para el HPV-16. Las muestras que no fueron diagnosticadas por Papanicolau fueron 51 lo que representa un 71.8% de falsos negativos por Papanicolau. Los protocolos de PCR fue de 25 uL para PCR consensus.

#### Conclusiones:

La utilización del VPH consensus es esencial para la determinación de Virus de Papiloma Humano debido a su alta sensibilidad. Aunque VPH fue relativamente alto (47.3%), de los tipos más oncogénicos sólo se detectaron 4 muestras. Si bien es cierto, el papanicolau es barato y fácil de realizar; su sensibilidad es muy baja. El PCR se puede utilizar para dar un seguimiento a las muestras diagnosticadas con procesos inflamatorios por papanicolau o para verificar la eficacia del tratamiento colposcópico. Logramos desarrollar un protocolo de 25 uL de volumen final necesitando poca muestra sondas y reactivos lo que abarata su costo pero para futuros protocolos se debe incluir un control interno.

Palabras Clave: Papiloma virus humano, PCR, papanicolau, adolescentes

## INTRODUCCIÓN

El VPH posee ADN de doble hélice y forma parte de la familia de los Papovavirus. Produce proliferaciones celulares benignas y malignas en regiones mucosas y cutáneas en sus huéspedes naturales. Desde la década de los 70s se ha observado que una de las áreas más sensibles para el ataque del virus, es el cuello uterino.

El cáncer Cérvico uterino es un problema de salud pública en los países subdesarrollados y se estiman unos 500,000. casos nuevos en el mundo y 190,000. muertes anuales (1). La infección por virus del Papiloma Humano (VPH) en el cuello y área vaginal puede causar cáncer Cérvico uterino y condiloma.

En Panamá, el cáncer es la primera causa de muerte en las mujeres, ocupando el cáncer cérvico uterino el primer lugar en muertes. La tasa de cáncer cérvico uterino en mujeres mayores de 15 años es de 53.7 por 100,000. habitantes (2).

Actualmente se reconocen más de 100 subtipos virales de VPH de los cuales más o menos 40 atacan las mucosas, principalmente el cuello uterino. En base al riesgo de contraer cáncer, los subtipos se han dividido en bajo y alto riesgo.

Dentro del grupo de alto riesgo están los subtipos: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59, 68, 73 y 82 (3). Según el tipo de lesión se pueden clasificar en típica y atípica. Y su diagnóstico se realiza mediante papanicolau, colposcopia, hibridización in situ, captura híbrida y PCR. La Optimización de los métodos diagnósticos ha permitido una positividad del 99.7% de HPV en los tumores analizados mediante la técnica de PCR.

De estos, el mas común es el tipo 16, con aproximadamente el 50% de los casos; luego el 18, con 18 a 20 % de los casos (4,5).

Por las razones antes descritas, consideramos importante determinar la frecuencia de aparición de VPH en una población de adolescentes jóvenes y tipificar HPV 16 y HPV 18, determinar el porcentaje de pacientes no diagnosticados por PAP, desarrollar un protocolo diagnóstico que utilice poca cantidad de reactivos para maximizar el ensayo.

### Materiales y Método

Es un estudio descriptivo en el cual se recolectaron 150 muestras del cuello uterino en pacientes atendidas en la Clínica de Planificación familiar del Centro de Investigación en Reproducción Humana del Instituto Conmemorativo Gorgas. Las edades oscilaban de los 13 a 24 años. Las muestras fueron tomadas con citobrush los cuales eran depositados en tampón de lisis celular para la posterior extracción del ADN. También se tomaban muestras para realizar el papanicolau. El ADN extraído (kit de Promega) era resuspendido en 50 uL de agua y se congelaba a - 20° C hasta la realización del PCR.

El VPH fue detectado por un cebador consensus MY09 y MY11 (Quiagen) y para la tipificación se utilizaron para el 16, cebadores HPV1015 y HPV1016 (Maxim Biotech).

Para el VPH 18 se utilizaron cebadores HPV 1017 y HPV1018 (Maxim Biotech). La tm para VPH 16 y VPH 18 fue de 55°C y para el consensus de 50°C. Cuadro 1.

Las muestras amplificadas fueron visualizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa. El fragmento del VPH consensus es de 450 pb, de HPV 16 es de 601 pb y para el HPV 18, de 360 pb. Figura 1.

Para el PCR se utilizo Mastermix (Promega). Los protocolos para la mezcla de reacción fueron: para el VPH consensus fue de 5uL de ADN, 3 uL de la mezcla de cebadores (escala de 50 nmoles) y 17uL de mastermix ( 50 units/mL, taqDNA Polymerase, ph 8.5, 400 uM de: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 3 mM MgCL2).

El protocolo para las tipificaciones por HPV 16 y 18 fue el siguiente: 5uL de muestra de ADN, 6 uL de cebadores (3 uL para 16 y 3 uL para 18) y 17 uL de mastermix. Los controles utilizados fueron tomados de muestras previamente tipificadas.

Se utilizaron termocicladores Eppendorf Mastercycler 96 pocillos y PCR Sprint de 24 pocillos. Tubos de reacción de 0.2 uL. Las muestras para amplificar fueron ensayadas en cámara de flujo laminar con presión negativa. Los geles de agarosa se prepararon al 1.5% en tampón TBE y 5 uL de bromuro de etidio. Se utilizaron 6 uL de muestras amplificadas y 3 uL de tinte de carga. Se sometía a 100 mv por una hora. Posteriormente, las muestras se visualizaban a través de una lámpara de luz ultravioleta para observar las bandas. Los marcadores de peso molecular eran 100 a 1000 pb.

## Resultados

El total de muestras que resultaron positivas para VPH fue de 71 (47.3%). De estos, resultaron positivas por PCR para VPH consensus 68 (45.3%). Esto representa que la técnica de PCR diagnosticó el 95.8% de las muestras, mientras que la técnica de PAP sólo determino VPH en sólo el 28.1% de las muestras. De estas muestras negativas por PAP y positivas para el VPH consensus, el 71.8% reportaron procesos inflamatorios, los cuales fueron diagnosticados positivos por PCR para el Virus del Papiloma Humano. La técnica de PCR obtuvo una correlación del 90.0% con respecto al papanicolau. Esto es debido a que dos muestras no fueron detectadas por PCR, una de las cuales estaba deteriorada. El PCR detectó 4 muestras positivas para VPH 18, de las cuales sólo una se le reportó marcado proceso inflamatorio; las otras tres no se les reportó nada por PAP. No se detectaron muestras positivas para VPH 16. Se logró desarrollar un protocolo para PCR de 25 uL de reacción total, sin embargo; este protocolo no incluyó un control interno de reacción que debe ser considerado para próximos ensayos.

## Discusión

Mucho se ha comentado acerca de la utilización o no de la técnica de PCR; sin embargo, el avance de la tecnología y al aumento en la demanda de las pruebas, contribuirá con el uso difundido de las mismas. El PCR es un método de alta sensibilidad y especificidad que además permite utilizar diferentes tipos de muestras para su ensayo y con otras aplicaciones como determinar riesgo aumentado, progresión de la lesión y tipificación de los diferentes subtipos (6).

La temperatura de anidación para VPH consensus se ensayó a 50°C para aumentar su sensibilidad. De esta manera se lograron detectar una gran cantidad de muestras positivas por VPH consensus y negativas por Papanicolau.

Cabe resaltar el hecho de que la técnica de PCR detectó 53 muestras más que la técnica de Papanicolau, destacándose un claro subregistro de este virus por una sensibilidad disminuida en el papanicolau. Es importante destacar que aunque la técnica de PCR permite una detección temprana de virus de Papiloma humano, el Papanicolau detecta los cambios citomorfológicos que evidencian la activación del virus. Pero para que estos cambios se den, debe pasar un período considerado de tiempo.

Debido a la alta sensibilidad del PCR, esta técnica pudo determinar que la mayoría de las muestras diagnosticadas con procesos inflamatorios por el papanicolau, en realidad eran muestras positivas por PCR consensus. En los protocolos actuales, las muestras que repiten procesos inflamatorios con el PAP son enviadas a las clínica de colposcopia para estudios más exhaustivos.

Detectar tempranamente el VPH es importante si el tipo de VPH es de alto riesgo. Interesantemente, tres de los cuatro subtipos VPH 18 detectados por PCR, no fueron diagnosticados por Papanicolau. Un tratamiento inicial podría eliminar por completo la presencia del virus del epitelio del cuello uterino y eliminar el riesgo potencial en las pacientes infectadas.

Aunque la mayoría de los estudios declaran que el VPH 16 es el más común, con un 50% de aparición, en nuestro estudio; no encontramos esta distribución. No detectamos ningún subtipo 16; en cambio se detectaron 4 subtipos VPH 18 (5.6%).n=71

## CONCLUSIONES

Encontramos una frecuencia de aparición del virus del Papiloma Humano de 47.3%. Para el PCR fue de 45.3% mientras que para el papanicolau fue de 20%.

Determinamos en esta población que la frecuencia de aparición de VPH tipo 18 fue de 5.6% y 0% para el VPH tipo 16 en esta población y en esta muestra.

Determinamos que el porcentaje de muestras no diagnosticadas por papanicolau fue del 71.8%.

Se logró estandarizar la técnica de PCR para HPV consensus, HPV 16 y 18 con un volumen de reacción muy bajo, lo que abarata el costo de las pruebas.

Encontramos que el tipo de Virus de Papiloma Humano encontrado con más frecuencia es el VPH 18 y no el VPH 16. Desconocemos si otro subtipo viral este afectando la población debido a que sólo se estudiaron el VPH 16 y 18.

Es necesario incluir en la reacción un control interno lo que incrementaría un poco el costo pero aumentaría la confiabilidad.

## RECOMENDACIONES

Debido a la alta sensibilidad de las pruebas de PCR, estas se deberían utilizar de manera rutinaria en las poblaciones adolescentes y clínicas de infertilidad; para asegurar un diagnóstico rápido seguro.

Una opción viable para clínicas con bajos recursos es utilizar el PCR en las muestras diagnosticadas con procesos inflamatorios por la técnica de papanicolau.

Realizar estudios muestrales en poblaciones generales y específicas nos indicarían la frecuencia de aparición de los subtipos, reduciendo así el número de cebadores a utilizar. El aumento de las pruebas diagnósticas a subtipos específicos abarataría por lo tanto el costo de las mismas permitiendo un impacto mayor en las poblaciones estudiadas.

## AGRADECIMIENTOS

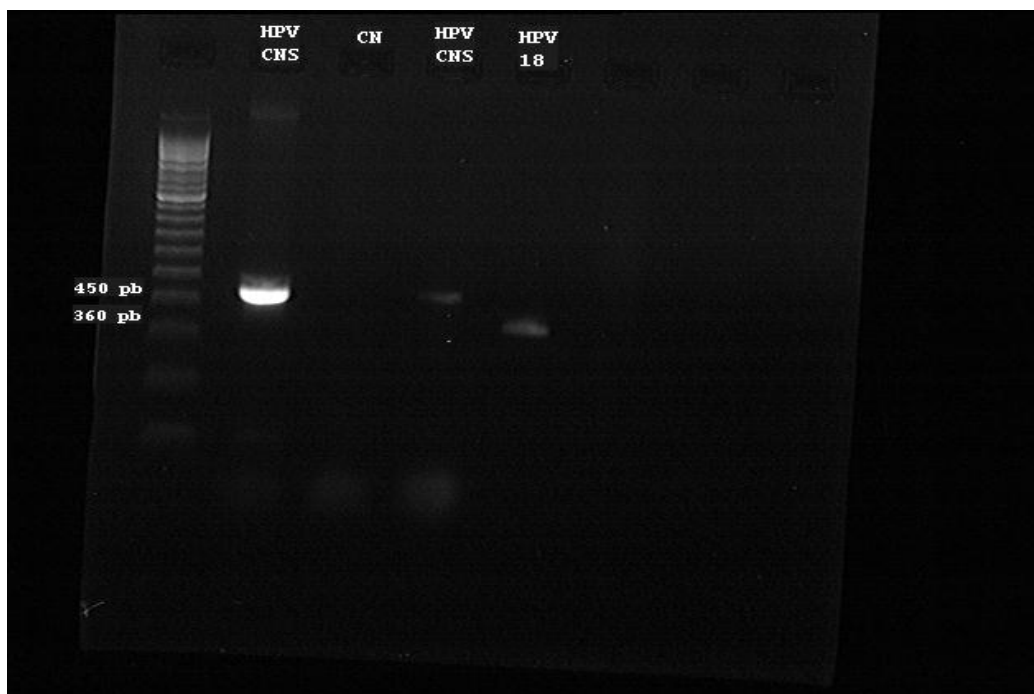
Se agradece al personal de la sección de Investigación Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud; asimismo a la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología de la Ciudad del Saber.

## Bibliografía

1. Pisan P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the Worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J.Cancer* 1999;83:18-29.
2. Boletín Minsa 2004. Estadísticas de Salud 2004. Dirección Nacional de Políticas de Salud. Sección de Registros de Estadísticas de Salud.
3. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. La Infección por Papilomavirus. Ed. Meditex. Grupo Saned. Marzo 2003.
4. Takashi, Y., Michelle, M., Julian, P. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worlwide Perspective. *Journal of Virology*. 1997;71,3:2463-2472.
5. Carillo A, Mohar A, Frias-Mrnfvil M, Solorza G, Liziano M. Utilidad de la combinación de oligonucleótido universales para la detección del virus del papiloma humano en cancer cervicouterino y lesions premalignas.2004: *Salud Pública de México*.46.1:7-16
6. Sotlar K., Diemer, D., et al. Detection and Typing of human papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004: 42.7: 3176-3184.

## ANEXOS

Figura 1. Consensus 450 pb y HPV 18 360 pb.



Cuadro 1. Secuencias de Cebadores Utilizados

Consensus	MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
	MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
HPV 16	HPV-1015	ACC GAA ACC GGT TAG TAT AAA AGC
	HPV-1016	TCA TTT AAT TGC TCA TAA CAG TAG
HPV 18	HPV-1017	CAC ACC ACA ATA CTA TGG CGC GCT
	HPV-1018	CTG CTG GAT TCA ACG GTT TCT GGC