

Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en mujeres con cáncer de cuello uterino en Bogotá y Barranquilla. Procedimientos técnicos y de diagnóstico

Detection and Typing of the Human Papilloma Virus in Women with Cervical Cancer in Bogotá and Barranquilla. Technical and Diagnostic Procedures

Mónica Molano¹, Raúl Murillo², Arlenne Cano², Óscar Gamboa², Jaime Ardila², Juan Carlos Mejía³, Gilberto Martínez⁴

- 1 Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.
- 2 Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.
- 3 Grupo de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Colombia.
- 4 Grupo de Ginecología, Clínica del Country, Bogotá. Colombia.

Resumen

Objetivo: Analizar los procedimientos técnicos y de diagnóstico en la detección de genotipos del virus del papiloma humano (VPH) en muestras con cáncer de cuello uterino. **Métodos:** Se tomaron tejidos incluidos en parafina de 268 casos de cáncer de cuello uterino, procedentes de Barranquilla y Bogotá. Se verificó el diagnóstico histológico mediante nuevos cortes y se analizó la calidad de las muestras mediante amplificación del gen de B-globina. En muestras B-globina negativas se realizaron nuevos cortes y nueva amplificación. La detección de VPH se realizó mediante iniciadores GP5+/GP6+biodirigidos hacia la región L1, y tipificación mediante EIA y RLB. En las muestras negativas para GP5+/GP6+ se desarrollaron PCR tipo específicas hacia la región E7 de 14 tipos de VPH de alto riesgo. **Resultados:** De las 268 muestras iniciales, 20 (7,46%) tuvieron diagnóstico histológico inadecuado; 55/248 muestras fueron inicialmente B-globina negativas, pero 29 se recuperaron con una segunda PCR realizada, dejando 26 B-globina negativas (10,5%). Se detectó VPH en 210/222 muestras adecuadas mediante GP5+/GP6+ (94,6%), y en 7 muestras adicionales (3,15%), mediante iniciadores dirigidos hacia E7. No se detectó infección en 2,25% de los casos. Se encontraron 24 tipos de VPH; los más prevalentes fueron el VPH-16 (50,9%), VPH-18 (12,7%), VPH-45 (8,8%), VPH-31 (6,5%) y VPH-58 (6,0%). Hubo un 16,6% de infecciones múltiples. **Conclusión:** El adecuado procesamiento y diagnóstico de las muestras y el uso de pruebas combinadas hacia las regiones L1 y E7 permiten una estimación óptima de la prevalencia de la infección en muestras incluidas en parafina.

Palabras clave: VPH, tipificación del ADN, neoplasias del cuello uterino, técnicas moleculares diagnósticas, Colombia.

Correspondencia:

Mónica Molano Luque. Instituto Nacional de Cancerología. Av. 1ª No. 9-85. Bogotá, Colombia. Tel.: +571-3341111 ext. 4205.

Correo electrónico: mmolano@cancer.gov.co

Fecha de recepción: 23 de febrero del 2009. Fecha de aprobación: 23 de febrero del 2010.

Abstract

Objective: To analyze the role played by technical and diagnostic techniques in the detection of diverse genotypes of the human papilloma virus (HPV) in cervical cancer samples. **Methods:** Paraffin fixed tissue samples were taken from 268 cases of cervical cancer in Bogotá and Barranquilla. Histological diagnosis was verified through new cuts and sample quality was analyzed through amplification of the β -globin gene. In the case of β -globin negatives, additional cuts and amplification were carried out. HPV detection was achieved using GP5+/GP6+ bio indicators directed towards the L1 region, and typing through EIA and RLB. Among GP5+/GP6+ negatives, specific PCR type was developed towards the E7 region of 14 types of high risk HPV. **Results:** Out of the initial 268 samples, 20 (7.46%) had inadequate histological diagnosis. Initially β -globin negative samples came to 55/248, but 29 recuperated with the realization of a second PCR, resulting in 26 β -globin negatives (10.5%). HPV was detected in 210/222 appropriate samples through GP5+/GP6+ (94.6%), and in 7 additional samples (3.15%) through the indicators directed towards E7. No infection was detected in 2.25% of cases. Twenty-four types of HPV were found, the most prevalent being HPV-16 (50.9%), HPV-18 (12.7%), HPV-45 (8.8%), HPV-31 (6.5%), and HPV-58 (6.0%). Multiple infection occurred in 16.6% of cases. **Conclusions:** The adequate processing and diagnosis of samples and the use of combined tests towards the L1 and E7 regions allows for the optimum appraisal of infection prevalence among paraffin fixed samples.

Key words: HPV, DNA typing, uterine cervical neoplasms, molecular diagnostic techniques, Colombia.

Introducción

Diferentes reportes en todo el mundo han mostrado que la infección por virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (1-4). Sin embargo, la detección del VPH en mujeres con cáncer de cuello uterino varía entre el 80% y el 99,7% (1,3,5-7). Estas diferencias dependen, principalmente, de la sensibilidad de la técnica utilizada y de la rigurosidad en el diagnóstico de la enfermedad.

En un estudio realizado por Walboomers y cols. en 1999 se encontró VPH en el 99,7% de mujeres con cáncer de cuello uterino, lo cual permitió establecer que el VPH es causa necesaria para el desarrollo de la enfermedad. Para ello se realizó un análisis minucioso del diagnóstico histológico, un análisis cuidadoso de la calidad del ADN, y se utilizaron tres juegos de iniciadores dirigidos hacia la región L1, la región E1 y la región E7 (1).

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para la detección y tipificación del VPH, las cuales muestran diferentes grados de sensibilidad y especificidad (8-13), que dependen no sólo de las características de la técnica utilizada, sino, también, de la clase de tejido analizado (tejido embebido en parafina, congelado, raspado cervical, etc.), de su calidad y de los reactivos utilizados. Por tal razón,

hasta el momento no hay una técnica *gold estándar* con la cual se pueda llegar a conclusiones definitivas; especialmente, en cuanto a la tipificación viral, donde se han encontrado diferencias notables en detección cuando se comparan diferentes técnicas entre sí (6,14-17).

Algunas de las recomendaciones dadas por la Organización Mundial de la Salud para detectar de manera óptima la infección es recurrir a procedimientos, técnicas y reactivos estandarizados, que hayan sido validados intra e inter laboratorios, y que hayan sido ampliamente utilizados en estudios clínicos y epidemiológicos (18,19).

Algunos investigadores han propuesto que realizar tipificación viral podría ser importante en tamización para discriminar mujeres que tienen un mayor riesgo de desarrollar lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y cáncer de cuello uterino. Así mismo, el conocimiento de la distribución de los distintos tipos de VPH es información de gran importancia para introducir la vacuna en Colombia.

En este reporte se presentan los resultados de un análisis de los procedimientos técnicos y de diagnóstico utilizados para detectar y tipificar la infección por VPH en tejido embebido en para-

fin de 268 mujeres con cáncer invasor de cuello uterino, procedentes de dos regiones de Colombia (Barranquilla y Bogotá), con alta y baja incidencia de la enfermedad (20).

Métodos

Para calcular el tamaño de la muestra se tomaron los datos de incidencia de cáncer de cuello uterino en Atlántico y Bogotá, correspondientes a 800 y 300 casos, respectivamente. La prevalencia esperada era del 57% para VPH16, y del 12,6% para VPH18, según datos disponibles para América Central y América del Sur; con base en ello, se utilizó una prevalencia esperada del 12,5% o más para las estimaciones.

Con el fin de obtener un IC95% entre el 7,5% y el 17,5% (correspondiente a un error estándar relativo del 80%) se estimó que se necesitaban 108 casos de cáncer para Barranquilla y 140 en Bogotá. La inclusión de casos fue secuencial hasta cuando se logró el tamaño de muestra estimado para cada ciudad. Se asumió que no hay estacionalidad en la presentación de infección por tipos de VPH, por lo cual una muestra secuencial para el tiempo descrito se comporta de forma aleatoria y representa los casos de todo el año.

Para el estudio se seleccionaron tejidos embebidos en parafina de casos incidentes de cáncer de cuello uterino durante el período 2006-2007, procedentes de IPS que representaran a usuarias de medicina prepagada (alta capacidad de pago), a usuarias del sistema de seguros (población trabajadora) pertenecientes al régimen contributivo y, finalmente, a usuarias de los regímenes subsidiado y vinculado (población de estratos socioeconómicos bajos). En total se incluyeron 17 centros clínicos y un consultorio particular.

En la Tabla 1 se presentan los diferentes centros participantes en Bogotá y Barranquilla. Patólogos de los diferentes centros escogieron, en orden secuencial, tejido embebido en parafina con diagnóstico de cáncer invasor del cuello uterino. Los tejidos embebidos en parafina se procesaron nuevamente en el Instituto Nacional de Cancerología, y se realizaron nuevos cortes para verificar el diagnóstico histológico original.

Tabla 1. Centros participantes por ciudad

| Bogotá | Barranquilla |
|---------------------------------------|--|
| Clinica del Country | Centro Médico del Norte Unidad Médica La Asunción |
| Clinica de la mujer | Hospital Universitario Metropolitano |
| Profamilia | Hospital General de Barranquilla |
| Liga de Lucha contra el Cáncer | UNIMEC |
| Hospital San José | Unidad Médica La Asunción |
| Hospital Kennedy | Centro Médico Continental |
| Instituto Nacional de Cancerología | Unidad Médica Villa Country Clinica Bautista Unidad Médica La Asunción |

Se utilizaron guantes y cuchillas nuevas con cada muestra, y se realizó de manera independiente el procesamiento de cada uno de los tejidos embebidos en parafina, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación.

Inicialmente se practicaron dos cortes externos de cuatro micrones, los cuales fueron desechados. A continuación, usando pinzas estériles, se hicieron algunos cortes para la realización de las láminas, de la coloración con H&E y de la confirmación del diagnóstico histológico.

Seguidamente se practicaron 10 cortes de 5 a 10 micrones, del mismo tejido, los cuales se depositaron en tubos de 1,5 mL, se les adicionó 1 mL de octano y se mezclaron a temperatura ambiente por 30 minutos.

Posteriormente se precipitó el raspado del tejido y los residuos de parafina por centrifugación a 12.000 g por 3 minutos, y se removió el octano de cada muestra con una pipeta Pasteur. Si la parafina estaba todavía presente se repetía el proceso de adición del octano, centrifugación y remoción.

A continuación se adicionó 0,5 mL de etanol al 100%, y se centrifugó a 12.000 g por 3 minutos. Se removió el máximo posible de etanol. Se adicionó 10 µL de acetona y se dejó secar el tubo abierto en un horno, a 55 °C. Posteriormente se le adicionó al tubo 100 µL de buffer digestión (200 µg/mL

de proteinasa K.), se incubó por 3 horas a 55 °C y se dejó toda la noche a 37 °C. Se centrifugó brevemente a 12.000 g y se inactivó la enzima a 95 °C por 10 minutos. Antes de realizar la PCR, se centrifugó brevemente y se utilizaron 10 µL de la muestra para la PCR.

Como control de calidad de la biopsia se realizó la amplificación del gen de la B-globina, mediante el uso de los iniciadores PCO3 y PCO5, que amplifican para un fragmento de 209 pb. Si la muestra fue B-globina negativa se realizaron nuevos cortes y se corrieron una vez más los ensayos de PCR.

El análisis de VPH se realizó usando los iniciadores GP5+/GP6+ biospecíficos para la región L1 del VPH. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 140 pares de bases. Las condiciones de la PCR fueron realizadas de acuerdo con los planteamientos de Roda *et al.* (1995) (21).

La detección tipo específica se realizó mediante un inmunoensayo enzimático (EIA), desarrollado por Jacobs y cols. en 1997 (22). En breve, las muestras positivas para VPH fueron sujetas a un análisis específico de grupo usando un coctel de sondas para 14 VPH de alto riesgo, y otro coctel de sondas para 23 VPH de bajo riesgo (23).

Las muestras positivas para cada uno de los grupos fueron analizadas mediante el uso de un ensayo RLB, desarrollado por Van den Brule y cols. para la tipificación específica de 37 tipos de VPH (23). Todas las sondas se sintetizaron con un grupo amino terminal 5', el cual fue usado para unir covalentemente las sondas a una membrana cargada negativamente (Byodine C). En breve, 10 µL de los productos de PCR biotinados (140 pb) fueron adicionados a 150 µL de 2X SSPE/0,1% SDS, y denaturados por 10 minutos a 99 °C. La membrana (con las sondas de oligonucleótidos) se colocaron en un *minibloter*, de tal manera que los pozos de siembra del *miniblot* quedaron perpendiculares a los oligonucleótidos. A los pozos de siembra se les aplicaron los productos de PCR (160 µL), y se hibridizaron por 60 minutos.

Las muestras fueron removidas del *minibloter* por aspiración, y la membrana fue lavada 2 veces en 2X SSPE/0,5% SDS a 51 °C. Posteriormente,

la membrana fue incubada con el conjugado de streptavidina-peroxidasa diluido 1:4000 en 2X SSPE/0,5% SDS por una hora, y posteriormente, lavada en 2X SSPE/0,5% por 10 minutos. Para la detección quimio-luminiscente del ADN hibridizado, la membrana se incubó en ECL líquido de detección, se expuso a un *film* (Hyperfilm) durante 10 minutos y se reveló la placa.

Adicionalmente, se desarrollaron 14 PCR tipo específicas hacia la región E7 del VPH en las muestras que dieron negativas para la región L1. Esto, con el fin de detectar muestras en las cuales se pudo haber perdido el fragmento de lectura abierta (ORF, por su sigla en inglés) de L1 durante los procesos de la integración viral. Iniciadores tipo específicos hacia la región E7 de los VPH tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, y que amplificaron un fragmento de aproximadamente 100 pb, se utilizaron de acuerdo con lo planteado por Walboomers y cols. y van den Brule y cols. (1,23).

Resultados

En total, se incluyeron en el estudio 268 muestras, de las cuales 20 (6 de Bogotá y 14 de Barranquilla) (7,46%) tuvieron que ser excluidas luego de revisar el diagnóstico histopatológico (Tabla 2). De 248 muestras con diagnóstico adecuado, 55 fueron B-globina negativas (22,1%); sin embargo, al realizar la segunda PCR con otros cortes de las mismas pacientes se logró recuperar 29 muestras, lo cual dejó un número final de 26 B-globinas negativas (10,5%).

De 222 muestras adecuadas, a 210 (94,6%) se les pudo detectar la infección por VPH mediante los iniciadores GP5+/GP6+ dirigidos hacia la región L1, y, adicionalmente, 7 de las muestras (3,15%) pudieron ser tipificadas utilizando los iniciadores dirigidos hacia la región E7. A 3 muestras sólo se les había detectado infección por VPH de bajo riesgo por GP5+/GP6+, pero al realizar la PCR específica hacia la región E7, 2 mostraron infección por VPH de alto riesgo (Tabla 3 y Figura 1). En total, a 217 muestras (97,75%) se les pudo detectar la infección por el VPH y realizar su tipificación. A las restantes 5 muestras (2,25%) no se les detectó la infección con ninguno de los iniciadores utilizados.

Tabla 2. Muestras que no correspondieron al diagnóstico inicial

| Resultado revisión histopatológica | No. de casos |
|--|--------------|
| Tejido sin evidencia de tumor | 1 |
| Tejido de otros órganos sin evidencia de tejido cervical | |
| Ovario | 1 |
| Vulva | 2 |
| Glándula mamaria | 1 |
| Tejido conjuntivo | 1 |
| Estructura anatómica tubular | 1 |
| Lesiones no infiltrantes | |
| Carcinoma escamocelular in situ | 8 |
| Neoplasia intraepitelial cervical grado III | 2 |
| Material no adecuado para diagnóstico histopatológico | 3 |
| Total | 20 |

Tabla 3. Infecciones detectadas utilizando los iniciadores dirigidos hacia la región E7

| No. caso | GP5+/GP6+ | E7 | VPH identificado |
|----------|-------------|----------|------------------|
| 66 | Negativo | Positivo | VPH 16 |
| 85 | Negativo | Positivo | VPH 18 |
| 86 | VPH 44 (BR) | Positivo | VPH 18 |
| 138 | Negativo | Positivo | VPH 18 |
| 139 | VPH 72 (BR) | Positivo | VPH 33 |
| 203 | VPH 44 (BR) | Negativo | - |
| 261 | Negativo | Positivo | VPH 16 |
| 277 | Negativo | Positivo | VPH 16 |
| 287 | Negativo | Positivo | VPH 18 |
| 311 | Negativo | Positivo | VPH 58 |

Nota: (BR): VPH de bajo riesgo

En cuanto a la distribución por ciudad, en Bogotá se obtuvieron 144 muestras con diagnóstico adecuado, 18 de las cuales fueron B-globina negativas (12,5%). De las 126 restantes, en 123 se pudo detectar VPH (97,6%) y en 3 no se pudo detectar la infección (2,39%). En Barranquilla se obtuvieron 104 muestras con diagnóstico adecuado, 8 de las cuales fueron B-globina negativas (7,76%). De las 96 muestras B-globina positivas, en 94 se pudo detectar VPH (97,9%) y en 2 no se logró (2,08%).

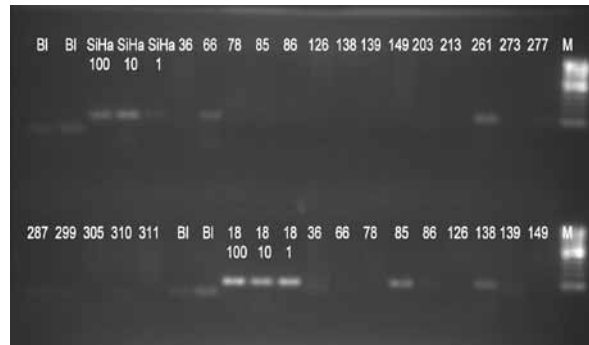


Fig. 1. PCR E7 de VPH 16 y 18 de controles positivos y negativos y de muestras incluidas en parafina.

De acuerdo con el diagnóstico histológico, el 85% de los casos tuvieron un diagnóstico de carcinoma escamocelular, sin diferencias significativas entre las ciudades; la mayoría de estos casos fueron no queratinizantes (principalmente, en Barranquilla), y en el grupo de los adenocarcinomas la mayoría fueron endocervicales (95,5%).

En resumen, 217 muestras fueron tipificadas usando los iniciadores GP5+/GP6+ y las PCR tipo específicas hacia E7 de 14 tipos de alto riesgo. De estas, 111 corresponden a VPH 16 (50,9%); 26, a VPH 18 (12,7%); 17, a VPH 45 (8,8%); 12, a VPH 31 (6,5%); y 11, a VPH 58 (6,0%) (Tabla 4). El 17,4% y el 4,1% correspondieron a infecciones múltiples por VPH de alto riesgo (VPH-AR) y por VPH de bajo riesgo (VPH-BR), respectivamente. La figura 2 muestra la prevalencia de infección de acuerdo con las ciudades.

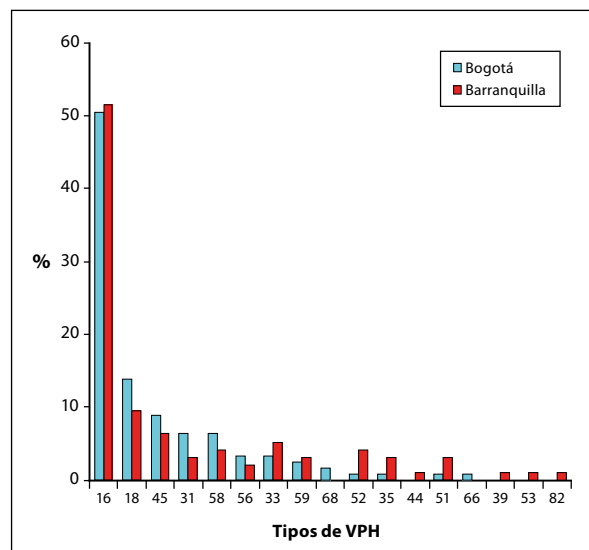


Fig. 2. Prevalencia de la infección por VPH en mujeres con cáncer de cuello uterino en Bogotá y Barranquilla

Tabla 4. Distribución de los tipos virales encontrados en el estudio

| Tipo de VPH | Infección única | Infección múltiple | Todas las infecciones | IC 95% |
|------------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------|-------------|
| Alto riesgo | | | | |
| Cualquier VPH-AR | 82,3% | 17,4% | 99,7% | 99,2 - 100% |
| VPH-16 | 48,0% | 2,9% | 50,9% | 44,5 - 57,3 |
| VPH-18 | 5,6% | 7,1% | 12,7% | 8,3 - 17,0 |
| VPH-45 | 7,0% | 1,8% | 8,8% | 5,1 - 12,5 |
| VPH-31 | 5,0% | 1,5% | 6,5% | 3,2 - 9,7 |
| VPH-58 | 5,0% | 1,0% | 6,0% | 2,8 - 9,0 |
| VPH-33 | 2,3% | 2,1% | 4,4% | 1,8 - 7,0 |
| VPH-56 | 1,5% | 1,7% | 3,2% | 1,0 - 5,5 |
| VPH-59 | 2,0% | 0,6% | 2,6% | 0,6 - 4,6 |
| VPH-51 | 1,2% | 0,8% | 2,0% | 0,3 - 3,8 |
| VPH-52 | 0,6% | 1,1% | 1,7% | 0,3 - 3,2 |
| Otros VPH-AR | 3,3% | 2,1% | 5,4% | - |
| Bajo riesgo | | | | |
| Cualquier VPH-BR | 0,3% | 4,1% | 4,4% | 1,7 - 7,1% |
| VPH-44 | 0,3% | 2,4% | 2,7% | 0,5 - 4,8 |
| Otros VPH-BR | - | 2,4% | 2,4% | - |
| Probable alto riesgo | | | | |
| VPH-26 | - | 5,6% | 5,6% | 2,6 - 8,5 |
| VPH-66 | 0,6% | 0,6% | 1,2% | 0,0 - 2,7 |
| VPH-53 | 0,3% | 0,9% | 1,2% | 0,0 - 2,4 |
| Riesgo no determinado | | | | |
| VPH-34* | - | 0,9% | 0,9% | 0,0 - 2,0 |
| VPH-83* | - | 0,6% | 0,6% | 0,0 - 1,7 |

Nota: Clasificación basada en Muñoz y cols; NEJM 2003.

*Tipos de VPH no encontrados en los estudios de casos y controles pero clasificados como de bajo riesgo de acuerdo a su origen filogenético.

Discusión

El presente estudio fue diseñado para evaluar la prevalencia de infecciones por VPH en un grupo de muestras de una región de alta incidencia de cáncer de cuello uterino, y de una región de incidencia media-baja. El enfoque principal se basa en los procedimientos técnicos realizados con el fin de evitar falsos negativos, debido a un diagnóstico inadecuado de las muestras, o a una subvaloración en la detección del VPH.

Los resultados de nuestros ensayos usando los iniciadores GP5+/GP6+ dirigidos hacia la región L1, el EIA y RLB para la tipificación y el desarrollo de las PCR tipo específicas hacia la región E7 hizo posible que se detectara el ADN del VPH en un 97,75% de las muestras B-globina positivas, porcentaje similar a lo reportado en estudios donde se utilizan más de 2 juegos de iniciadores para detectar la infección por VPH (1,24,25).

La prevalencia de infección usando sólo el juego de iniciadores de GP5+/GP6+ fue del 94,6%, el cual es también un porcentaje similar al reportado en la mayoría de estudios que utilizan un único juego de iniciadores (26-28), y superior a las tasas de detección encontradas durante estudios previos realizados en el país (29).

Utilizar iniciadores dirigidos hacia la región E7 nos permitió aumentar el porcentaje de detección de VPH (posiblemente integrado) en un 3,15%, y el cual, probablemente, no pudo ser identificado por los iniciadores dirigidos hacia la región L1 por interrupciones o deleciones en el ADN del VPH a la altura del ORF L1 (1). Aunque para tener certeza de esta conclusión se deben realizar ensayos de integración, nuestros datos apoyan la hipótesis, ya que el alto porcentaje de VPH 18 (44,4%) negativo con los iniciadores dirigidos hacia la región L1, y detectado en el análisis de E7, sugiere una elevada integración de este tipo viral.

Diferentes estudios previos han mostrado que casi todos los carcinomas de cuello uterino positivos para VPH 18 contienen el ADN integrado (30,31), mientras que para VPH 16 el porcentaje de integración es del 60% o menos (30-32).

La ventaja de usar iniciadores hacia la región E7 es que aumenta el porcentaje de detección de VPH posiblemente integrado; sin embargo, hay que realizar un número mayor de PCR. En nuestro estudio, para analizar 14 muestras a las que no se les había detectado la infección de VPH, o sólo se les había detectado una infección por un VPH de bajo riesgo, se debieron realizar 196 PCR (14 PCR por muestra), lo que implica una inversión considerable de tiempo y recursos.

El desarrollo de nuevas técnicas basadas en PCR multiplex y de sondas específicas para E7 para ser usadas en inmunoensayos o RLB podrían ser de gran apoyo en la ejecución de este tipo de estudios, pues aumentan el porcentaje de detección viral y disminuyen los falsos negativos.

En cuanto a las cinco muestras negativas para infección por VPH, es posible que tengan características específicas, como disrupciones en sus secuencias, cargas de infección muy bajas u otra condición que haya inhibido las PCR utilizadas. Uno de los problemas de trabajar con biopsias incluidas en parafina es que la calidad del ADN se puede afectar, y encontrarse fragmentado; adicionalmente, en ocasiones se presentan problemas de inhibición de las PCR por los químicos utilizados durante la fijación del tejido y de la calidad de la parafina utilizada.

Aunque en nuestro caso no se observaron diferencias importantes en la calidad del ADN entre Bogotá y Barranquilla, a pesar de las diferencias climáticas y la cantidad de centros participantes, en nuestro estudio, el 10,5% de los casos fueron B-globina negativos aun después de recuperar algunas muestras mediante nuevos cortes. Este porcentaje es similar, o aun menor, al encontrado en otros estudios donde se utilizan tejidos incluidos en parafina, pero también es mayor comparado con estudios donde se utilizan tejidos congelados o raspados cervicales donde la calidad del ADN se ve menos afectada (10,11).

Algunos trabajos que han comparado la sensibilidad de las técnicas más usadas en el mundo, muestran cómo estas tienen sensibilidades similares en la detección global de la infección por VPH (15,16,33,34); sin embargo, cuando se realizan tipificaciones específicas y análisis de infecciones múltiples se encuentran diferencias notables entre estas.

En 1997 Qu W. y cols. compararon GP5+/GP6+ y MY09/11, y los resultados sugirieron que MY09/11 tenía una mayor sensibilidad para detectar VPH 53 y 61 y una mayor capacidad de detectar infecciones múltiples, mientras que GP5+/GP6+ mostró una mayor sensibilidad para detectar infecciones por VPH 35 (16). Sin embargo, las comparaciones realizadas entre las dos técnicas no fueron valoradas frente a un estándar de oro, sino que se asumieron como verdaderos los resultados de cada una de las técnicas.

Así mismo, el análisis tuvo limitaciones debido a que el GP5+/GP6+ utiliza para la tipificación específica un inmunoensayo (EIA), el cual no fue realizado en ese estudio comparativo, y algunas de las oligosondas usadas para la tipificación específica, al parecer, estaban fuera de la región que amplifican los iniciadores GP5+/GP6+, lo cual pudo afectar la identificación específica de algunos tipos virales, y, por tanto, la comparación de los resultados (16).

En nuestro estudio tuvimos un 17,5% de infecciones múltiples, lo cual está dentro del rango reportado en otros estudios, y no se tuvieron problemas con la detección del VPH 53. (17,19).

En la actualidad la técnica de SPF 10 ha sido propuesta como una técnica altamente sensible para la detección de ADN de VPH, debido a que amplifica un fragmento de 65 pb, óptimo para muestras en las cuales la calidad del tejido se ve afectada. No obstante, el uso de esta tecnología no se halla exento de controversia, y en recientes estudios, donde se compara su sensibilidad con la de otras técnicas, se han observado diferencias en la detección tipo específica: por ejemplo, en un estudio realizado por van Doorn y cols., en el que se comparó la sensibilidad del ensayo PGMY09/11 con el ensayo SPF10-PCR, se observaron tasas más altas de detección de VPH 42, 56 y 59 con el PGMY09/11, mientras que el SPF10 detectó más VPH 31 y 52 (17).

En otro estudio, realizado por Castle y cols. en 2008, y durante el cual se compararon las mismas técnicas, se observó que con el PGM09/11 hubo una mayor tasa de detección de VPH 16, VPH 18, VPH 39, VPH 58, VPH 59, VPH 66, y VPH 68/73, mientras que el SPF10 detectó más VPH 31 y VPH 52 (15). Debido a que no hay un *gold estándar*, Klug y cols. realizaron un estudio en el que compararon 5 diferentes técnicas de detección del VPH (GP5+/GP6+, el SPF10, PGM09/11, El PCR y el VPH DNA Chip) tomando a cada una de ellas como *gold estándar*. Los resultados mostraron porcentajes de sensibilidad muy variables entre técnicas, en cuanto a identificación tipo específica, con una mayor sensibilidad reportada para el SPF10. Sin embargo, cuando se analizó la especificidad de los ensayos, esta técnica fue la que mostró una especificidad menor (6).

Contar con una técnica que sea altamente sensible y específica para utilizarla en programas de tamización es una gran necesidad en todo el mundo para disminuir el número de seguimientos en mujeres positivas para VPH (35). Es importante mencionar que el GP5+/GP6+, el cual utilizamos en nuestro estudio, se caracteriza por tener estas características (14), ha sido validado en estudios de investigación básica, epidemiológicos y clínicos de todo el mundo (3,35-37) y, junto con la captura de híbridos 2 (Hc2), ha sido ampliamente utilizada en grandes ensayos controlados aleatorizados y en estudios de seguimiento (35).

En cuanto a la detección de tipos específicos, nuestro estudio es comparable con estudios multicéntricos realizados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por su sigla en inglés), y con algunos metaanálisis en el mundo entero (3,19,36,38). Las infecciones por VPH 16 y 18 se han reportado siempre como las más frecuentes en cáncer invasor, con pequeñas variaciones entre regiones, y con una prevalencia un tanto menor en Latinoamérica y región del Caribe (39), con porcentajes similares a los reportados en nuestro estudio.

En cuanto a la comparación de las prevalencias de infección entre las dos ciudades, no se observaron diferencias significativas; sin embargo, se observó que en Barranquilla (área de mayor riesgo)

el porcentaje de infecciones por VPH 18, 45, 31 y 58 fue menor que en Bogotá, mientras que la presencia de tipos de VPH de alto riesgo menos comunes fue mayor, resultados que muestran un comportamiento de prevalencia semejante a cuando se comparan países desarrollados con países en desarrollo.

Otro aspecto muy importante en nuestro análisis fue el cuidado en el diagnóstico histológico. Si no se hubiera realizado la confirmación patológica, se habría tenido un diagnóstico inadecuado en 20 muestras (7,46%), lo que habría conllevado un menor porcentaje de detección de VPH, o un mayor porcentaje de detección de VPH de bajo riesgo asociado a lesiones preneoplásicas o a tejido vecino. Este problema en la realización de un diagnóstico histológico inadecuado se observa no sólo en este tipo de lesiones, sino que se ve aumentado al diagnosticar neoplasias intraepiteliales de cuello uterino de alto y bajo grado.

Este inadecuado diagnóstico ha llevado a discrepancias en datos de prevalencias e incidencias de la infección en lesiones preneoplásicas, por lo cual se debe utilizar un mayor número de controles, o desarrollar estrategias complementarias que lleven a un óptimo diagnóstico de la enfermedad y al conocimiento de la distribución de los distintos tipos de VPH; esto tendrá una importancia creciente a medida que se incremente el uso de vacunas y la vigilancia virológica correspondiente.

En conclusión, el uso de técnicas moleculares estandarizadas y validadas en todo el mundo y la rigurosidad en el diagnóstico histológico conducen a una estimación óptima de la prevalencia de la infección en esta enfermedad.

Reconocimientos

Este estudio fue financiado por Glaxo Smith Kline mediante el contrato 108928 EPIHPV-ICC suscrito entre el GSK y el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. Los autores agradecen a los patólogos de Bogotá y Barranquilla por su apoyo en la recolección de las muestras y adicionalmente a los doctores Álvaro González y Jesús Pérez por su ayuda para acceder a las instituciones de salud participantes en la ciudad de Barranquilla.

Referencias

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-9.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-65.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6):518-27.
- Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004;111(2):278-85.
- Wu EQ, Zhang GN, Yu XH, Ren Y, Fan Y, Wu YG, et al. Evaluation of high-risk human papillomaviruses type distribution in cervical cancer in Sichuan province of China. *BMC Cancer*. 2008;8:202.
- Klug SJ, Molijn A, Schopp B, Holz B, Iftner A, Quint W, et al. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. *J Med Virol*. 2008;80(7):1264-74.
- Gheit T, Vaccarella S, Schmitt M, Pawlita M, Franceschi S, Sankaranarayanan R, et al. Prevalence of human papillomavirus types in cervical and oral cancers in central India. *Vaccine*. 2009;27(5):636-9.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
- Kleter B, van Doorn L-J, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1731-9.
- Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastro-wijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2508-17.
- Dabić MM, Hlupić L, Babić D, Jukić S, Seiwert S. Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification in situ hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch Med Res*. 2004;35(6):511-6.
- Cheah PL, Looi LM. Detection of the human papillomavirus in cervical carcinoma: a comparison between non-isotopic in-situ hybridisation and polymerase chain reaction as methods for detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Malays J Pathol*. 2008;30(1):37-42.
- Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2009;156(1-2):77-83.
- Hesselink AT, van Ham MA, Heideman DA, Groothuis-mink ZM, Rozendaal L, Berkhof J, et al. Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3215-21.
- Castle PE, Porras C, Quint WG, Rodriguez AC, Schiffman M, Gravitt PE, et al. Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3437-45.
- Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304-10.
- van Doorn LJ, Quint W, Kleter B, Molijn A, Colau B, Martin MT, et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV line blot assay and the SPF(10) line probe assay. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):979-83.
- Pagliusi SR, Dillner J, Pawlita M, Quint WG, Wheeler CM, Ferguson M. International standard reagents for harmonization of HPV serology and DNA assays-an update. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/193-200.
- Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. HPV type distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/26-34.
- Piñeros M, Ferlay J, Murillo R. Cancer incidence estimates at the national and district levels in Colombia. *Salud Pública Méx*. 2006;48(6):455-65.
- De Roda Husman AM, Walboomers JM, van der Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 4):1057-62.
- Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papi-

- llomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):791-5.
23. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):779-87.
 24. Sigurdsson K, Taddeo FJ, Benediktsdottir KR, Olafsdottir K, Sigvaldason H, Oddsson K, et al. HPV genotypes in CIN 2-3 lesions and cervical cancer: a population-based study. *Int J Cancer.* 2007;121(12):2682-7.
 25. Illades-Aguar B, Cortés-Malagón EM, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Alarcón-Romero LD, Fernández-Tilapa G, et al. Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prev.* 2009;32(4):300-7.
 26. Chichareon S, Herrero R, Muñoz N, Bosch FX, Jacobs MV, Deacon J, et al. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(1):50-7.
 27. Ngelangel C, Muñoz N, Bosch FX, Limson GM, Festin MR, Deacon J, et al. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(1):43-9.
 28. Stevens MP, Tabrizi SN, Quinn MA, Garland SM. Human papillomavirus genotype prevalence in cervical biopsies from women diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer in Melbourne, Australia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(3):1017-24.
 29. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer.* 1992;52(5):743-9.
 30. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65(2):606-12.
 31. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, Garcia-Carranca A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 1994;56(5):640-5.
 32. Matsukura T, Koi S, Sugase M. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology.* 1989;172(1):63-72.
 33. van Ham MA, Bakkers JM, Harbers GK, Quint WG, Massuger LF, Melchers WJ. Comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2662-7.
 34. van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3122-9.
 35. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009;124(3):516-20.
 36. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007;121(3):621-32.
 37. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, 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;366(9490):991-8.
 38. 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(1):63-73.
 39. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP, Piñeros M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 11:L1-L15.