

Original

Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales

A. Suárez Moya¹, J.I. Esquivias Gómez², J.A. Vidart Aragón³ y J.J. Picazo de la Garza¹

Servicios de ¹Microbiología Clínica, ²Dermatología y ³Ginecología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

RESUMEN

Últimamente se ha observado un notable incremento de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), y se ha confirmado la relación etiológica entre ciertos genotipos del VPH y el cáncer genital. Por ello hemos evaluado la prevalencia de estos virus y su genotipo en muestras genitales, utilizando técnicas de diagnóstico molecular. Procesamos 401 muestras genitales de 281 mujeres y 120 hombres, todos ellos con un diagnóstico compatible con infección por VPH. La detección del virus se realizó por PCR, y las muestras positivas se tipificaron mediante una técnica de microseries de sondas de hibridación que permite detectar los 35 tipos de VPH más frecuentes asociados a mucosas. De los 401 pacientes estudiados, 185 resultaron positivos (46,1%) y en 133 casos sólo se detectó un tipo de VPH. Encontramos que fueron positivos el 41,6% de las mujeres y el 56,7% de los hombres. Se tipificaron en total 260 VPH; 154 resultaron ser de alto riesgo oncogénico e infectaban a 16 hombres (23,5%) y 88 mujeres (75,2%) ($p < 0.001$). El VPH tipo 6 fue el más frecuente, detectado en 64 casos, seguido del VPH 16 en 52 casos. La prevalencia de infección por VPH encontrada ha sido del 46%. Más de la mitad de los pacientes estaban infectados por VPH de alto riesgo. La presencia de VPH de alto riesgo fue significativamente más alta en las mujeres.

Palabras clave: Virus del papiloma humano - Reacción en cadena de la polimerasa - Microseries de sondas de hibridación

Detection and typing by molecular biology of human papillomavirus in genital samples

SUMMARY

Recently, there has been a marked increase in human papillomavirus (HPV) infection, and the etiological relationship between some HPV genotypes and genital cancer has been confirmed. Therefore, we used current molecular biology techniques to evaluate the prevalence of these viruses and their genotype in genital samples. We processed 401 genital samples from 281 women and 120 men, all with a diagnosis compatible with HPV infection. Virus was detected using PCR, and positive samples were typed using an array technique which enabled us to detect the 35 most common types of mucous-associated HPV. Of the 401 patients studied, 185 (46.1%) were positive, and only one type of HPV was detected in 133 cases. We found that 41.6% of the women and 56.7% of the men were positive. A total of 260 HPVs were typed; 154 were high oncogenic risk. They infected 16 men (23.5%) and 88 women (75.2%). The difference was statistically significant ($p < 0.001$). Type 6 HPV was the most frequently detected in 64 cases, followed by HVP 16 in 52 cases. We found a 46% prevalence of HPV infection. More than half of these patients were infected by high-risk HPV. The presence of high-risk HPV was significantly higher in women.

Key words: Human papillomavirus - Polymerase chain reaction - Microseries hybridization probe array

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus pequeño, de 55 nm de diámetro, cubierto por una cápside que contiene una doble hebra de DNA circular. Su tamaño oscila entre 6800 y 8400 pb. El genoma está formado por diez regiones codificadoras o de transcripción (ORF), que se designan tempranas E1-E8 y tardías L1-L2, y una no codificadora (NCR o URR) (1). Se multiplica dentro de la célula infectada y se caracteriza por producir cambios morfológicos en el tejido epitelial, como acantosis o hiperqueratosis, así como por la capacidad de inducir el desarrollo de tumores en el tejido infectado (2). Numerosos estudios han correlacionado la infección por VPH con la aparición de tumores de diversa localización y malignidad.

Como consecuencia de su transmisión sexual, la infección por VPH constituye una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente, pues en general la mayoría de las mujeres y de los hombres sexualmente activos han estado expuestos a estos virus en algún momento de su vida, lo que tiene una gran importancia sobre todo si se considera la asociación que existe entre la infección por algunos VPH y la aparición de carcinomas genitales (3).

Hasta hoy se han identificado más de cien tipos de VPH según sus diferencias en la secuencia de DNA (4). De ellos, alrededor de 40 pueden infectar la región anogenital. De acuerdo con el riesgo oncogénico, la clasificación de los VPH no está definida totalmente, pero para Muñoz y cols. (5) son de bajo riesgo los VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108, y de alto riesgo los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82. Los tipos 26, 53 y 66 deben considerarse probables carcinógenos.

La infección por VPH de bajo riesgo, sobre todo por los VPH 6 y 11, produce lesiones anogenitales benignas o infecciones subclínicas que suelen ser transitorias y casi siempre se resuelven, pero los de alto riesgo se asocian con displasias y carcinomas cervicales, y se ha comunicado que las infecciones persistentes por los tipos 16 y 18 se relacionan con el desarrollo de cáncer de cuello uterino (1-3, 5, 6).

Para el correcto diagnóstico etiológico, ya que los VPH no crecen en los medios habituales de cultivo y los estudios serológicos sólo tienen una validez limitada, deben utilizarse técnicas de detección de ácidos nucleicos, de las cuales la amplificación genómica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera la más adecuada (7). Los VPH que en general se encuentran relacionados con lesiones en el tracto genital comparten en su genoma una homología en la secuencia de las regiones L1 y E6, y es esta región común a los VPH genitales la que se amplifica mediante iniciadores "consenso". La utilización poste-

rior de sondas de hibridación permitirá su tipificación, que es sumamente importante debido a la asociación de ciertos tipos con el cáncer genital (8). Considerando que en los últimos años se ha observado un notable incremento de la infección por VPH, y que se ha confirmado la relación etiológica de ciertos genotipos con el cáncer genital, el objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar durante el año 2005, en nuestro hospital, la prevalencia de estos virus y su genotipo en muestras genitales, aplicando una moderna tecnología de biología molecular.

MÉTODOS

Pacientes

Hemos estudiado 401 pacientes de ambos sexos. Fueron 281 mujeres de edades comprendidas entre 15 y 64 años (media de 35,8 años), provenientes de las consultas del Servicio de Obstetricia y Ginecología, todas con signos clínicos o citológicos que sugerían de infección por VPH, y 120 hombres de edades comprendidas entre 16 y 53 años (media de 33,2 años) procedentes de la consulta de enfermedades de transmisión sexual del Servicio de Dermatología, que presentaban lesiones compatibles con el diagnóstico de infección por VPH o eran asintomáticos pero con factores de riesgo y sospecha de estar infectados.

Muestras

Las muestras genitales a estudiar eran biopsias, frotis o raspados genitales de las lesiones o de la zona sospechosa de infección. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta ser procesadas. En todas se estudió la presencia de DNA del VPH, y en las positivas se procedió a su tipificación. Para ello, después de extraer y purificar el DNA se realizó una amplificación genómica mediante PCR con iniciadores consenso, y luego las positivas se tipificaron utilizando microseries de sondas de hibridación.

Extracción y purificación del DNA

En el caso de las biopsias se tomaron dos cortes de cinco micras del bloque de parafina, o un fragmento de la biopsia, y en el caso de los frotis se utilizó el precipitado celular obtenido tras agitar la torunda con solución salina, decantando y centrifugando la suspensión celular. Para la extracción del DNA se utilizó un protocolo con una solución de lisis con proteinasa K (20 mg/ml), incubándose a 56°C durante una a tres horas en un baño o bloque térmico con agitación hasta que la muestra estaba totalmente lisada.

Después de inactivar la proteinasa a 70 °C durante 10 minutos se procedió a la purificación del DNA extraído utilizando columnas (*Magic DNA clean-up system Promega*). Cada diez muestras se incluía un control negativo.

Amplificación genómica

Para la amplificación utilizamos 5 µl del DNA extraído y 45 µl de una mezcla de reacción de PCR, empleando los iniciadores consenso MY09 y MY11, descritos por Resnick y cols. (8), que amplifican una región L1 conservada.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 9 minutos, seguidos de 45 ciclos con unas temperaturas de 94 °C para la desnaturalización durante 30 segundos, 55 °C para el apareamiento durante un minuto y 72 °C durante 90 segundos para la extensión. Finalmente se mantuvieron ocho minutos más a 72 °C para la extensión final.

La detección del producto amplificado se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, visualizándolo mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Los resultados se interpretaron como positivos si aparecía una banda de 450 pb correspondiente al VPH. La banda de control genómico es de 892 pb y la del control interno de amplificación es de 1202 pb. Se consideraron negativas aquellas muestras en las cuales solamente se pudo visualizar la banda correspondiente al DNA genómico.

Se utilizaron diferentes áreas y laboratorios para la preparación de la muestra, la amplificación y la detección. Se utilizaron puntas de pipetas con filtro y el cambio de guantes fue tan frecuente como resultó necesario.

Tipificación

La tipificación se realizó utilizando el equipo *Papillomavirus Clinical arrays* (Genomica), que permite detectar los 35 tipos de VPH más frecuentes en mucosas, asociados a riesgo oncogénico alto, intermedio o bajo.

Este sistema detecta automáticamente los tipos de manera individualizada, de modo que pueden identificarse infecciones simples o coinfecciones.

La técnica se basa en una serie de sondas de hibridación de baja densidad incluida en la parte inferior de un tubo tipo Eppendor, donde se realizan el análisis y la detección colorimétrica, y donde se interpretan y emiten los resultados de manera automática. La muestra amplificada y marcada con biotina se añade a la microserie de sondas en la cual se produce la hibridación con sus respectivas sondas específicas inmovilizadas en zonas concretas y conocidas del tubo. Después se incuba con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa que se une a la biotina, y la actividad peroxidasa hace que aparezca un producto insoluble en presencia del sustrato TMB (3-3'-5-5'-tetrametilbenzidina), es decir, hay precipitación en las zonas del tubo donde hay hibridación. La precipitación produce un cambio en la transmisión óptica, que es detectada por el lector.

Como control de calidad de la muestra se incluyó DNA genómico y un control interno de amplificación para evitar falsos negativos. Cada sonda correspondiente a cada tipo de VPH y controles se presenta por triplicado, lo que asegura los resultados obtenidos mediante un análisis estadístico de tres medidas para un mismo parámetro.

Método estadístico

Se aplicó la prueba de asociación de caracteres cualitativos por medio del criterio de distribución χ^2 de Pearson.

RESULTADOS

De los 401 pacientes estudiados, 185 resultaron positivos (46,1%), de los cuales 117 eran mujeres (41,6%) y 68 hombres (56,7%). De los positivos, en 133 casos sólo se detectó un tipo de VPH y en los 52 restantes las infecciones fueron mixtas, por dos VPH en 35 casos, por tres en 13 y por cuatro o cinco tipos en cuatro casos (Tabla 1).

Treinta y siete muestras no pudieron ser evaluadas por no contener DNA genómico. Se tipificaron en total 260 VPH. El tipo 6 fue el más frecuente, en 64 casos, seguido del VPH 16 en 52 casos, el 58 en 30 casos, el 11 en 23 casos, y el 18 y el 53 en 15 casos. En las infecciones mixtas, el VPH 16 fue el más frecuente entre los de alto riesgo y el

Tabla 1. Infección por VPH, única o múltiple, y distribución por sexo.

Pacientes (n)	Un tipo	Dos tipos	Tres tipos	Más de tres tipos	Total VPH
Hombres (68)	54	10 (20)	3 (9)	1 (4)	87
Mujeres (117)	79	25 (50)	10 (30)	3 (14)	173
Total (185)	133	35 (70)	13 (39)	4 (18)	260

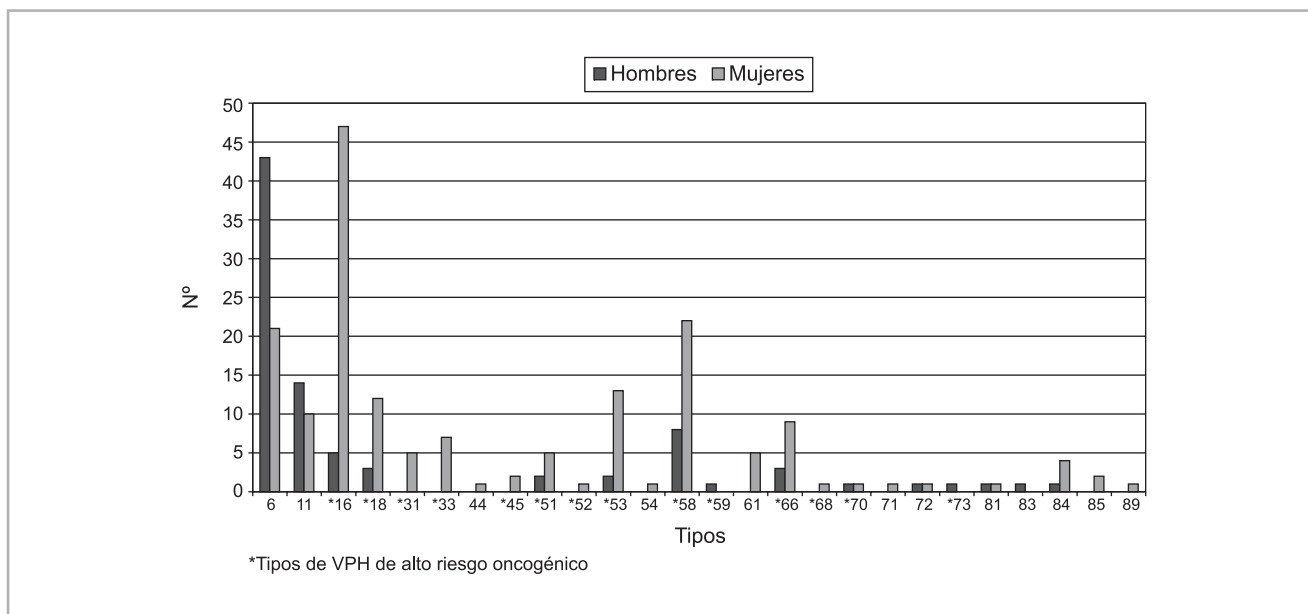


Figura 1. VPH detectados y distribución por sexo.

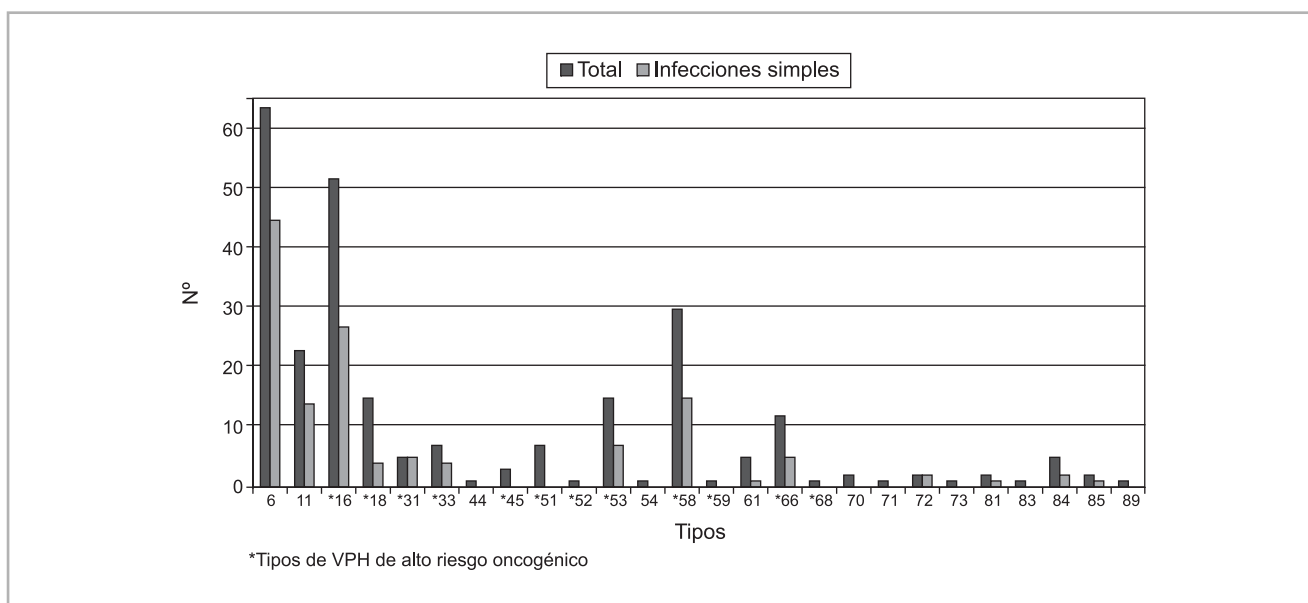


Figura 2. VPH detectados en infecciones simples y múltiples.

6 entre los de bajo riesgo oncogénico. No se detectó ninguno de los tipos 26, 35, 39, 40, 42, 43, 56, 62 y 82 (Fig. 1). Los tipos detectados con más frecuencia en los hombres fueron el 6 y el 11, y en las mujeres el VPH 16 (Fig. 2).

De las 185 muestras positivas, 104 estaban infectadas al menos por un VPH de alto riesgo oncogénico (56,2%). Se detectaron, pues, 154 VPH de alto riesgo oncogénico, en 67 ocasiones como infección simple y en 37 como infecciones mixtas: 25 dobles, ocho triples y cuatro con más

de tres tipos de VPH. De los 154 VPH de alto riesgo detectados, 27 procedían de 16 hombres y 127 de 88 mujeres, lo que significa que el 75,2% de las mujeres positivas estaban infectadas por VPH de alto riesgo, mientras que en el caso de los hombres lo estaba el 23,5% (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.001$) (Fig. 3).

Respecto a las lesiones que presentaban los pacientes, los datos se muestran en la Tabla 2. Las mujeres tenían condilomas en 25 casos, lesiones compatibles con displa-

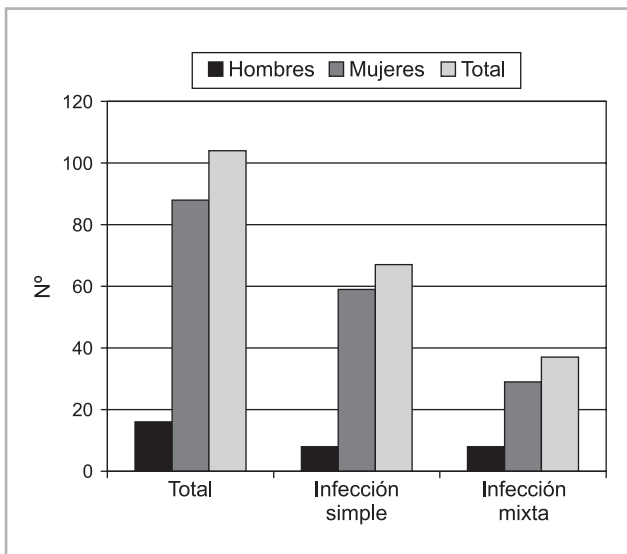


Figura 3. VPH de alto riesgo oncogénico.

sias cervicales en 126 casos, y los 130 restantes presentaban factores de riesgo de infección por VPH. Los pacientes varones con condilomas eran 59 y el resto presentaban factores de riesgo de infección por VPH.

DISCUSIÓN

Los métodos de detección de la infección por VPH incluyen el examen colposcópico, la citomorfología y la histología de las lesiones, la observación en el microscopio electrónico y la inmunoquímica; sin embargo, debido a la baja sensibilidad y especificidad de estas técnicas, en muchas ocasiones no es posible el diagnóstico definitivo de infección por VPH (7). Las citologías habituales no diagnostican un porcentaje considerable de casos de importantes anomalías en las células del cuello uterino, lo que ha despertado el interés por emplear la detección de DNA del VPH, ya que además puede predecir qué mujeres corren riesgo de padecer lesiones precancerosas (9).

Los VPH no pueden ser cultivados *in vitro* y los estudios serológicos tienen una exactitud limitada, ya que no distinguen infección actual de pasada, por lo que lo ade-

cuado es buscar el DNA del VPH (4, 10). En nuestro trabajo hemos utilizado la amplificación mediante PCR con iniciadores consenso, por su mayor sensibilidad refrendada en diversas publicaciones (4, 5, 7, 8).

La hibridación con sondas específicas sin amplificar previamente tiene una baja sensibilidad, y además sólo detecta VPH de alto o bajo riesgo oncogénico (11, 12). La amplificación con iniciadores específicos de tipo, al amplificar un solo biotipo, resulta muy laboriosa para conocer los 35 tipos, ya que además debe ser validada para cada uno de ellos (4, 7). Por tanto, parece mejor amplificar una zona del genoma que esté conservada en la mayoría de los genotipos que infectan mucosas, como L1, y proceder después a la tipificación (13). La PCR en tiempo real ha mejorado la sensibilidad, aunque con el inconveniente de generar falsos positivos, sobre todo por la heterogeneidad de los diferentes genotipos a los productos de PCR de amplio espectro, que dificulta la estandarización de los resultados. Además, aunque posibilita la cuantificación del DNA, y podría distinguir infecciones clínicamente relevantes, aún no se ha establecido cuál sería el umbral significativo (7, 14).

Para la tipificación parece que lo más adecuado es utilizar sondas de hibridación, aunque existen diferentes técnicas, como la detección en placa de múltiples pocillos (15), que cuenta con la desventaja de necesitar un gran volumen de producto amplificado; la utilización de sondas inmovilizadas (16); o la hibridación con microseries de sondas (*microarrays* o *chips*), que amplía la detección de infecciones múltiples y parece prometedor (17). Nosotros hemos aplicado esta última técnica, con la cual se obtienen resultados de manera rápida y objetiva, y además permite detectar en la muestra, al mismo tiempo, infecciones mixtas.

Más de un 80% de las mujeres sexualmente activas sufren una infección por VPH a lo largo de su vida (3). Los tipos 6 y 11 son los principales causantes de lesiones anogenitales, que se manifiestan en forma de verrugas y aparecen en el 1% a 2% de los adultos; su tratamiento es caro, doloroso y con frecuentes recidivas. En nuestro estudio son causa de lesiones condilomatosas, y el tipo 6 infecta sobre todo a los varones, mientras que el VPH 11 lo encontramos por igual en ambos sexos.

Tabla 2. Tipos de lesiones e infección por VPH.

	Condilomas		Displasias cervicales		Sin lesión, con factores riesgo	
	Total	Positivo	Total	Positivo	Total	Positivo
Hombres	59	36			61	32
Mujeres	25	15	126	47	130	56

La asociación entre determinados tipos de VPH de alto riesgo y el cáncer de cérvix está bien establecida (1, 3, 5, 8, 9, 18-21). En el 99,7% de los cánceres de cuello uterino existe DNA del VPH, siendo el tipo 16 la causa del 57,6%, y si consideramos también el tipo 18 asciende al 71,7% (19). Nosotros hemos obtenido datos similares con respecto a los VPH de alto riesgo oncogénico. Hemos encontrado 52 VPH tipo 16, de los que 47 infectaban a mujeres, pero no podemos establecer la relación con el cáncer de cérvix, pues la presencia de DNA del VPH de alto riesgo oncogénico identifica tanto a las mujeres con cáncer de cuello uterino como a las que corren especial riesgo de padecerlo, pudiendo prevenirse si se detecta y se trata pronto.

Aunque los métodos de detección sistemática del VPH reducen el riesgo, no previenen la infección ni el desarrollo de lesiones precancerosas, que requieren un seguimiento y tratamiento cuidadosos, por lo que se deben considerar también las posibles estrategias de prevención (21). Parece probable que la combinación profiláctica y terapéutica de una vacuna ofrezca una significativa reducción de la muerte por cáncer cervical en el mundo (22). Al efecto beneficioso de la vacunación frente a los tipos oncogénicos de VPH (16 y 18) podría añadirse una vacuna contra los tipos no oncogénicos 6 y 11 para la profilaxis de verrugas genitales en hombres y mujeres, pues estas lesiones, si bien son de bajo riesgo, hay que tenerlas también muy en cuenta porque aunque el pronóstico es benigno son difíciles de tratar y muy costosas (23).

Por todo lo dicho, consideramos que el VPH no sólo hay que detectarlo y genotificarlo, sino también tratarlo y si es posible prevenir su infección. Una vacuna multivalente dirigida contra los VPH 6, 11, 16 y 18 podría ser eficaz frente a los tipos de VPH que causan el cáncer y las verrugas genitales, reduciendo sustancialmente las infecciones y la enfermedad clínica causada por estos tipos.

Correspondencia: Avelina Suárez, Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Pza. Cristo Rey s/n, 28040 Madrid. Tel.: 91 330 34 84, Fax: 91 330 34 78; e-mail: asuarez.hcsc@salud.madrid.org

BIBLIOGRAFÍA

- Margall Coscojuela, N. Infecciones por Papilomavirus. Editorial Médica Panamericana, Madrid 2006.
- Doorbar, J. *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl.): 7-15.
- Gravitt, P.E., Jamshidi, R. *Diagnosis and management of oncogenic cervical human papillomavirus infection*. Infect Dis Clin North Am 2005; 19: 439-458.
- Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., Doorn, L.J. *Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections*. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl.): 43-51.
- Muñoz, N., Bosch, F.X., De Sanjosé, S. y cols. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med 2003; 348: 518-527.
- Leung, A.K., Kellner, J.D., Davies, H.D. *Genital infection with human papillomavirus in adolescents*. Adv Ther 2005; 22: 187-197.
- Van Doorn, L.J., Kleter, B., Quint, W.G.V. *Molecular detection and genotyping of human papillomavirus*. Expert Rev Mol Diagn 2001; 1: 394-402.
- Resnick, R.M., Cornelissen, M.T., Wright, D.K. y cols. *Detection and typing of human papillomavirus in archival cancer specimens by DNA amplification with consensus primers*. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1477-1484.
- Mandelblatt, J.S., Lawrence, W.F., Womack, S.M. y cols. *Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer*. JAMA 2002; 287: 2372-2381.
- Sun, Y., Eluf-Neto, J., Bosch, F.X. y cols. *Serum antibodies to human papillomavirus 16 proteins in women from Brazil with invasive cervical carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8: 935-940.
- Cope, J.U., Hildesheim, A., Schiffman, M.H. y cols. *Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2262-2265.
- Tena, D., Garrido, N., Menéndez, J.M. y cols. *Utilidad de la detección del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante Hybrid Capture® II en mujeres con citologías anormales del cuello uterino*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 474-478.
- Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T.Q. y cols. *Improved amplification of genital human papillomaviruses*. J Clin Microbiol 2000; 38: 357-361.
- Fontaine, J., Gravit, P., Duh, L.M. y cols. *High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 2200-2207.
- Snijders, P.J., Van den Brule, A.J., Jacobs, M.V., Pol, R.P., Meijer, C.J. *HPV DNA detection and typing in cervical scrapes*. Methods Mol Med 2005; 119: 101-114.
- Van Doorn, L.J., Quint, W., Kleter, B. y cols. *Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMV Line blot assay and the SPF₁₀ line probe assay*. J Clin Microbiol 2002; 40: 979-983.
- Liu, C., Ma, W., Zhang, B., Shi, R., Zheng, W. *Study on development of DNA microarrays for human papillomavirus (HPV) diagnosis*. Wei Sheng Wu Xue Bao 2003; 43: 613-618.
- Burd, E.M. *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 1-17.
- Muñoz, N. *Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence*. J Clin Virol 2000; 19: 1-5.
- Editorial. *High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine*. Science 2005; 308: 618-621.
- Baseman, J.G., Koutsky, L.A. *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl.): 16-24.
- Stern, P.L. *Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination*. J Clin Virol 2005; 32 (Suppl.): 72-81.
- Villa, L.L., Costa, R.L.R., Petta, C.A. y cols. *Vacuna de partículas de tipo viral LI de papilomavirus humano tetravalente (tipos 6, 11, 16 y 18) profiláctica en mujeres jóvenes: Ensayo multicéntrico de eficacia de fase II, controlado con placebo, doble ciego y aleatorizado*. Lancet Oncology 2005; 6: 271-278.