

ARTICULO ORIGINAL

Una propuesta rápida y económica para detectar el virus de papiloma humano por PCR a partir de muestras cervicales con reactivo desnaturizante**A rapid and economic option for human papillomavirus detection by PCR in cervical samples with denaturing reagent****Jiménez G^I, Mendoza L^{I*}, Arbiza J^{III}, Picconi A^{II}, Mongelós P^I, Castro A^I, Páez M^I**^IInstituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay^{II}Servicio de Virus Oncogénico. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI), "Dr. Malbrán" Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS), Buenos Aires, Argentina^{III}Sección de Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay**RESUMEN**

Trabajos han demostrado la utilidad de la captura híbrida II (CH II®) en la detección del virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (HR-HPV) como método de tamizaje primario para detección de cáncer de cuello uterino, así como las bondades de la PCR que permite acceder a métodos de tipificación viral. Por ello el objetivo fue detectar el genoma del HPV por PCR a partir de muestras de CH II® cien veces diluidas. Estudio transversal en 141 muestras cervicales de mujeres con citología normal y anormal que concurren al IICS, UNA. Las muestras fueron procesadas por CH II® y almacenadas con reactivo desnaturizante a -80°C. Luego, las muestras fueron diluidas 100 veces con agua destilada y posteriormente procesadas por PCR. Se detectó HPV en 51% y 43% de las muestras analizadas por CH II® y PCR, respectivamente. Diecisiete de 23 muestras positivas por CH II® con carga viral relativa baja fueron negativas por PCR. Esto podría deberse a la degradación del material. Además, 6 muestras negativas por CH II® fueron positivas por PCR sugiriendo presencia de infección con tipos virales no incluidos en CH II®. Estos resultados sugieren que es posible realizar la detección de HPV por PCR en muestras procesadas por CH II® previa dilución. Esta propuesta rápida, sencilla y económica, minimiza el riesgo de perder el material genético en la extracción y permite acceder a métodos de tipificación viral que podrían contribuir con datos sobre tipos de HPV circulantes para realizar una vigilancia en la era post-vacunal.

Palabras clave: detección de HPV, muestra cervical, reactivo desnaturizante, captura híbrida II®, PCR.

ABSTRACT

Studies have demonstrated the usefulness of the hybrid capture II (CH II®) in the detection of oncogenic high risk human papillomavirus (HR-HPV) as a primary screening method for detection of cervical cancer, as well as the benefits of PCR that allows access to viral typing methods. The objective was to detect HPV by PCR from cervical samples processed by CH II®. It was a cross-sectional study including 141 cervical samples of women attending the IICS, UNA. The samples were processed by CH II® and stored with denaturing reagent at -80°C. Then, they were diluted 100 times with distilled water and subsequently processed by PCR. HPV was detected in 51% and 43% of the samples

*Autor Correspondiente: **Dra. Laura Mendoza**, Departamento de Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Iturbe 1184, P.O. Box 2017, Asunción, Paraguay.

Email: lauramendozatorres@gmail.com

Fecha de recepción: febrero 2014; Fecha de aceptación: mayo 2014

analyzed by CH II® and PCR respectively. Seventeen of 23 positive samples by CH II® with relatively low viral load were negative by PCR. This could be due to degradation of the material. In addition, six negative samples by CH II® were positive by PCR suggesting the presence of infection with HPV types not included in CH II®. These results suggest that it is possible to detect HPV by PCR from samples processed by CH II® prior dilution. This is a quick, easy and economic alternative which minimizes the risk of losing the genetic material in the extraction process, and allows access to viral typing methods that could provide data about circulating HPV types to carry out surveillance in the post-vaccine era.

Keywords: HPV detection, cervical sample, denaturing reagent, hybrid capture II ®, PCR.

INTRODUCCIÓN

Según datos del 2012, el cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en América del Sur. El 85% de los casos nuevos ocurre en países en vías de desarrollo. La tasa de incidencia en América del Sur es de 20,4 por 100.000 mujeres. Paraguay presenta una tasa de incidencia y mortalidad del 34,2 y 15,7 por 100.000 mujeres respectivamente, encontrándose entre las más altas detectadas a nivel mundial (1).

El virus del papiloma humano (HPV) es un factor etiológico necesario para desencadenar en dicho cáncer. Se han detectado más de 100 tipos de HPV, de los cuales, aproximadamente 40 tipos infectan la mucosa del cérvix. Estos son clasificados como bajo riesgo oncogénico (LR-HPV) o alto riesgo oncogénico (HR-HPV) según su potencial oncogénico. El grupo de HR-HPV comprende los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 que son detectados en más del 95% de los casos de carcinoma del cérvix (2-4).

El uso de la citología ha tenido muy poco impacto en la incidencia y mortalidad de cáncer de cuello uterino en América Latina. Esto se puede explicar principalmente por la baja sensibilidad de la prueba y el elevado porcentaje de mujeres con anormalidades citológicas que no son evaluadas y/o tratadas adecuadamente (4).

El HPV no puede ser aislado de células, por ello, las pruebas diagnósticas dependen de técnicas moleculares como: 1) Método de captura híbrida II ® (CH II), aprobado por la *food and drug administration* (FDA), que permite la detección en forma rápida del DNA viral de 13 tipos de HPV de alto riesgo oncogénico con una sensibilidad de 1 pg/ml de DNA viral proporcionando valores de carga viral relativa, pero no determina el tipo viral específico presente y 2) Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con cebadores consenso, la cual asociada a la técnicas de hibridación, secuenciamiento o polimorfismo de fragmentos de DNA obtenidos por enzimas de restricción (RFLP), permiten realizar la tipificación específica de aproximadamente 40 tipos de HPV (5-7).

La validez y precisión de la prueba que reconoce los 13 genotipos de alto riesgo del HPV ha sido evaluada extensamente en varios estudios en Latinoamérica y en el mundo. Se ha demostrado consistentemente que la prueba es más sensible que la citología y la inspección visual con ácido acético (IVAA) y menos específica que la citología para la detección de lesiones de alto grado, y que este problema de baja especificidad es más agudo en mujeres menores de 30 años. Como consecuencia de esta observación, Estados Unidos y México han introducido la prueba como método adjunto a la citología o como método primario (seguido de triaje con citología) en mujeres mayores de 30 años; otros países están evaluando rigurosamente la posibilidad de reemplazar la citología por la prueba de HPV en tamizaje primario. Se espera que la prueba de HPV sea utilizada en tamizaje primario, triaje para selección de tratamiento, seguimiento de mujeres tratadas y más adelante como estrategia de vigilancia de mujeres vacunadas contra la infección (4).

Estudios realizados en varios países por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer demostraron que los tipos de HPV difieren en su potencial oncogénico, siendo el HPV-16 detectado en el 50 a 60% de los casos de cáncer de cuello uterino, seguido del HPV-18 detectado en el 14% de los casos (7-9). En base a estos estudios, la realización de la técnica de PCR para determinar el tipo específico presente en muestras positivas para HR-HPV por el método de CH II®, puede orientar acerca de la presencia de HPV 16. Estudios de cohorte determinan que mujeres con infección persistente por HPV 16 poseen mayor probabilidad de desarrollar lesiones precancerosas al ser comparadas con mujeres infectadas por otros tipos de HPV (8-10).

La prevalencia de infección por HPV, así como también la distribución de tipos virales varían según región geográfica y severidad de la lesión del cuello uterino (11,12). Por tanto, realizar estudios de tipificación viral pueden contribuir con datos epidemiológicos que ayudará a ser un control post-vacunal de los tipos circulantes.

Estudios anteriores, han propuesto métodos de extracción y de recuperación del DNA del HPV a partir de las muestras de CH II® guardadas con medio de transporte y reactivo desnaturizante, a fin de combinar las ventajas de ambas metodologías, pero los métodos actualmente descriptos demoran de horas hasta dos días (6,13,14).

El Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), institución cuya finalidad es la investigación y el servicio a la comunidad, logró incorporar al país la técnica de CH II®, para la detección de HR- HPV, además de desarrollar la técnica de PCR para la tipificación del virus. Con miras a proporcionar datos que puedan contribuir al manejo del paciente y al conocimiento epidemiológico, el objetivo del presente trabajo descriptivo de corte transversal fue detectar el genoma del HPV por PCR a partir de muestras de CH II® con medio de transporte y reactivo desnaturizante cien veces diluidas, a fin de permitir la realización de ambas metodologías con una sola toma de muestra ofreciendo así una opción nueva, rápida y eficaz que permita eliminar el paso de extracción o purificación de DNA ya detallados en trabajos anteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de cuello uterino procesadas por CH II®

Se incluyeron un total de 141 muestras de cuello uterino de mujeres con citología normal y anormal que fueron remitidas por médicos especialistas al Laboratorio de HPV del Departamento de Salud Pública y Epidemiología del IICS para realizarse la detección de HR-HPV por el método de CH II® (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA), con inicio de relaciones sexuales y sin tratamiento previo, desde noviembre del 2006 hasta marzo del 2009. De las 141 mujeres incluidas 82 presentaron resultados citológicos de ausencia de lesión intraepitelial escamosa (NSIL), 53 de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) y 6 de lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL). Los diagnósticos citológicos de mujeres con LSIL y HSIL fueron corroborados con estudios anatomopatológicos.

Las muestras procesadas por el método de CH II® fueron consideradas positivas para HR-HPV (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) cuando el valor de la relación entre las unidades relativas de luz de la muestra y el control positivo (URL/PC) eran mayor o igual a 1. Del total de muestras procesadas 72 (52%) fueron positivas para HR-HPV. Los valores de carga viral relativa observados fueron de 1 a 2074,69 URL/PC. La carga viral relativa fue dividida en cuatro categorías según sus valores; de 1 a menores que 10 pg/mL: carga viral baja, de 10 a menores que 100 pg/mL: carga viral intermedia, de 100 a menores que 1000 pg/mL: carga viral alta e igual o mayores que 1000 pg/mL: carga viral muy alta (15).

Luego de haber sido procesadas por CH II®, todas las muestras fueron almacenadas en medio de transporte estándar proveído por Qiagen, (Gaithersburg, MD, USA), con reactivo desnaturalizante, en medio alcalino a -80°C desde noviembre del 2006 hasta marzo 2009.

Dilución de las muestras procesadas por CH II®

A fin de determinar la dilución ideal de las muestras procesadas por CH II®, se realizaron diluciones con agua destilada estéril de 1/10 y 1/100 de 4 muestras positivas no incluidas en este trabajo y con valores de cargas virales relativas de: 5 URL/PC, 50 URL/PC, 100 URL/PC, 1000 URL/PC. Ambas diluciones de dichas muestras fueron analizadas por el método de PCR con cebadores consenso MY09/11 (16). En todas las diluciones de 1/10 se obtuvieron resultados negativos, mientras que con las diluciones de 1/100 todas las muestras cervicales fueron positivas para DNA HPV por el método de PCR.

En base a estas observaciones, se procedió a realizar diluciones de 1/100 de las 141 muestras incluidas en el estudio.

Detección de HPV por el método de PCR

La detección genérica del genoma viral fue realizada en primera instancia por PCR utilizando el sistema de cebadores consenso MY 09/11 que amplifican un fragmento de 450 pares de bases (pb) del gen viral L1 (16). Brevemente, la PCR se desarrolló en un volumen final de 10 ul conteniendo 5 ul de dilución 1/100 de la muestra cervical, solución tamponada 1X, 2,5 mM MgCl₂, 1uM de cada cebador, 240 uM de cada dNTP y 0,04 U/ul de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación se realizó mediante el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C, 3 min seguida de 35 ciclos: 94 °C, 1 min/55 °C, 1 min/72 °C, 1 min, con una extensión final a 72 °C, 5 min. Por cada 10 muestras se amplificó como control positivo una muestra cervical positiva no incluida en el estudio y agua destilada estéril como control negativo. A todas las muestras se les realizó una PCR específica para β globina (control interno) siguiendo las indicaciones detalladas en Saiki et al., 1985 (17).

Asuntos Éticos

Todos los datos colectados en este estudio se procesaron en forma de códigos y se almacenaron en una computadora, a la cual, solo tuvieron acceso los investigadores asegurando así la confidencialidad. El presente estudio fue aceptado por el Comité de Ética del IICS, UNA.

RESULTADOS

Del total de 141 muestras de cuello uterino procesadas por CH II® según el diagnóstico citológico, se observaron resultados positivos para HR-HPV en 72 muestras; 24% de mujeres con NSIL, 87% de mujeres con LSIL y 100% de mujeres con HSIL. Los resultados son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Detección por CH II® de HR-HPV en muestras de cuello uterino según diagnóstico citológico

Diagnóstico Citológico	Nº total de muestras de cuello uterino	Nº de muestras positivas para HR-HPV N° (%)
NSIL	82	20 (24)
LSIL	53	46 (87)
HSIL	6	6 (100)
Total	141	72 (51)

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial; L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; HR-HPV: virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico.

Sesenta y una de las 141 muestras conteniendo reactivo desnaturalizante analizadas por PCR con cebadores MY09/11 presentaron resultados positivos para HPV, correspondiendo un 21% a mujeres positivas para HPV con diagnóstico citológico de NSIL, un 72% para mujeres con LSIL y un 100% para mujeres con HSIL. Los resultados se representan en la Tabla 2. Todas las muestras fueron positivas para β globina.

Tabla 2. Detección de HPV por PCR en muestras cervicales con reactivo desnaturalizante de CH II® según diagnóstico citológico

Resultado citológico	Nº total de muestras	Nº de muestras positivas para HPV N° (%)
NSIL	82	17 (21)
LSIL	53	38 (72)
HSIL	6	6 (100)
Total	141	61 (43)

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial; L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado; HR-HPV: virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico.

Al comparar los resultados obtenidos por CH II® para HR-HPV y PCR para detección de HPV se observó una diferencia en 23 muestras, de las cuales 6 de las muestras negativas para CH II® obtuvieron un resultado positivo para PCR y 17 de las muestras positivas por CH II® fueron negativas por PCR.

En relación a la carga viral relativa de las muestras positivas para HR-HPV analizadas por CH II® se observó que un 100% de las muestras con carga viral relativa intermedia, alta y muy alta obtuvieron un resultado positivo por PCR, sin embargo 17/23 de las muestras con baja carga viral relativa tuvieron un resultado negativo por PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Detección de HPV por PCR a partir de muestras positivas para HR-HPV por CH II® según carga viral relativa

Carga viral relativa	Baja < 10	Intermedia 10 a < 100	Alta 100 a < 1000	Muy alta \geq 1000	Total
PCR(+)	6	17	17	15	55
PCR(-)	17	0	0	0	17
Total	23	17	17	15	72

DISCUSIÓN

Debido a la necesidad de usar métodos moleculares complementarios que permitan realizar la detección de HR-HPV, así como la determinación del tipo viral específico, trabajos anteriores han propuestos utilizar métodos de extracción previa a la determinación del tipo viral específico por PCR, a partir de muestras con reactivos desnaturizantes procesadas por CH II® para HR-HPV. Con miras a facilitar la utilización conjunta de ambas técnicas, el presente estudio preliminar a diferencia de los estudios descriptos anteriormente sugiere realizar en sustitución del método de extracción una dilución de las muestras procesadas por CH II®.

Diecisiete muestras positivas por CH II® y con baja carga viral relativa presentaron un resultado negativo por PCR. Estos resultados podrían deberse a que las muestras con bajas cargas virales relativas pueden sufrir una degradación del DNA, debido al reactivo desnaturizante utilizado en CH II® y los procesos de congelación. Cabe destacar que estos resultados son comparables a los observados con métodos de extracción anteriormente citados, lo cual sugiere que la dilución previa de la muestra permite amplificar fragmentos de DNA por PCR con sensibilidades comparables (6, 13,14).

Seis de las muestras negativas para CH II® fueron positivas por PCR. Esto puede deberse a la infección por tipos de HPV no detectados por la CH II®, debido a que el método de PCR permite detectar un amplio espectro de tipos HPV, lo cual podría contribuir a conocer la frecuencia de otros tipos de HPV circulantes.

En suma, los resultados obtenidos sugieren que; una previa dilución de cien veces de las muestras procesadas por CH II® conteniendo reactivo desnaturizante permite realizar la detección de HPV por PCR, siendo esta una propuesta rápida, sencilla y económica, la cual minimiza el riesgo de perder el material genético en el proceso de extracción sugerido por trabajos anteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. GLOBOCAN. [Internet] 2012. Lyon: WHO, 2012. [citado oct. de 2013]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. Zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys Acta*. 1996 Oct; 1288(2):55-78.
3. 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 Sep;189(1):12-19.
4. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, Jerónimo J, Salmerón J, Ferreccio C, et al. New paradigms and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America. *Salud Pública Mex* 2010, 52(6):544-59.
5. Sijvarger CC, González JV, Prieto A, Messmer AG, Mallimaci MC, Alonio VL, et al. Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 2006;38: 19-24
6. Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SFM, Sarian LO, Zeferino LC, Samara Messias, et al. DNA recovery from Hybrid Capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *Journal of Virological Methods*.2005; 126:197-201.
7. Hubbard, RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2003;127:940-45.
8. 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 Jul 20;97(14):1072-9.
9. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-71.
10. Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer*. 1996 Oct 21; 69(5):364-68.

11. Bruni L, Díaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010, 202(12): 1789-99.
12. 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 Aug 1; 121(3): 621-32.
13. Campos EA, Simões JA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Rocha Pitta D, Levi JE, et al. Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a universal collection medium with denaturing reagent. *Journal of Virological Methods* 2008; 147: 333–37.
14. LaMere BJ, Howell R, Fetterman B, Shieh J, Castle PE. Impact of 6-month frozen storage of cervical specimens in alkaline buffer conditions on human papillomavirus genotyping. *Journal of Virological Methods* 2008; 151: 298–300.
15. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN 3 or cervical cancer. *Lancet* 2002 Jul 20; 360: 228-29.
16. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Cancer Cell* 1989; 7: 209-214.
17. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230(4732): 1350–54.