

## ORIGINALES

# Significado del test del VPH en pacientes con citologías diagnosticadas como ASCUS y dentro de la normalidad

J. Azúa-Romeo\*, J.M. Grasa Ulrich\*\*, J. De Azúa-Blanco\*\*\*, J.M. Grasa-Biec\*\*, M. Tovar\*\*\*\* y A. Santamaría\*\*\*\*

\*Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

\*\*Unidad de Análisis Dr. Grasa S.L. Zaragoza. España. \*\*\*Facultad de Medicina. Zaragoza. España.

\*\*\*\*Centro de Salud Gayarre. Tudela. España. \*\*\*\*\*Servicio de Obstetricia y Ginecología. Cures Integrals de la Dona. Lleida. España.

## SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) infection is the main etiologic factor in the development of squamous cervical neoplasm. The study is based on HPV assay by means of molecular mixed hybridisation and capture of specific sequences of viral DNA in patients with non-dysplastic cytology. Two groups were defined depending on their diagnostic cytology: within normal limits (WNL) and atypical squamous cells of uncertain significance (ASCUS), dividing itself into ASCUS of probable reactive origin (ASCUS-R) and ASCUS that is probably dysplastic origin (ASCUS-D).

In the non ASCUS-D group (WNL and ASCUS-R) 15% of the samples were HPV positive, whilst in 81% of the ASCUS-D HPV was detected. The WNL group had three positive results in previous controls which became negative in latter controls.

In conclusion, detection of HPV by hybridisation and capture is a very useful technique in patients with inconclusive viral action cytology, which present with a high clinical suspicion of infection. Furthermore, it is a reliable tool to reclassify those cytologies reported as ASCUS as possible dysplasia and thus increase the follow-up of these patients. We believe that the best screening method for cervico-vaginal cancer is based on the Pap test, helped by HPV detection.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el papilomavirus (VPH) es el principal factor etiológico en el desarrollo de la neoplasia de cérvix. A principios de 1990<sup>1</sup> se identifica

ron 62 tipos de VPH; los tipos 16, 18 y 31 se han encontrado en alrededor del 90% de los cánceres invasivos.

Existen diferentes técnicas para demostrar la presencia de VPH, de las cuales la captura de híbridos es la única que permite identificar qué tipo de virus (de alto o bajo riesgo) está presente en una lesión concreta<sup>2</sup>.

La infección por el VPH puede ser completamente asintomática<sup>3</sup> e incluso no demostrar alteraciones morfológicas en el estudio citológico o biópsico, motivo por el cual en ciertas condiciones la única manera de certificar la infección es por medio de la determinación del ADN viral.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han revisado 11.000 citologías cervicovaginales (triple toma de Wied) realizadas en un laboratorio privado, y se ha determinado el VPH en pacientes sin citologías displásicas actuales o antecedentes de lesiones cervicales. Partiendo del resultado del estudio citológico se establecen dos grupos:

1. Dentro de los límites de la normalidad (DLN): 20 casos.

2. Atípicas escamosas de significado indeterminado (ASCUS), que a su vez se divide en: a) ASCUS-R, que incluye las muestras con celularidad ligeramente alterada, tal vez causada por fenómenos reparativos o inflamatorios, pero que no inducen sospecha de presencia viral ni pueden ser clasificadas como displásicas (12 casos), y b) ASCUS-D, con indicios de acción viral y celularidad discretamente alterada (11 casos).

En total se han estudiado 43 muestras correspondientes a 40 pacientes, dado que en tres de ellas se realizó un control 6 meses después de un primer resultado positivo.

Todos los extendidos han sido diagnosticados por separado por un citopatólogo experto y por un patólogo.

Aceptado para su publicación el 23 de septiembre de 2002.

**TABLA I. Resultados de la hibridación**

EDAD	RATIO BR	BR	RATIO AR	AR	PAP	EDAD	RATIO BR	BR	RATIO AR	AR	PAP
40	0,13	0	0,13	0	DLN	49	0,33	0	0,46	0	R
43	0,16	0	0,12	0	DLN	55	0,21	0	0,34	0	R
42	0,54	0	0,61	0	DLN	39	0,49	0	1,01	1	R
32	0,64	0	0,63	0	DLN	51	0,52	0	0,83	0	R
34	0,62	0	0,71	0	DLN	33	0,66	0	0,65	0	R
46	0,51	0	0,66	0	DLN	45	0,57	0	18,51	1	R
48	0,51	0	0,64	0	DLN	49	0,65	0	0,54	0	R
25	0,20	0	0,28	0	DLN	45	0,45	0	0,45	0	R
41	0,21	0	0,26	0	DLN	25	0,73	0	10,01	1	R
43	0,43	0	0,55	0	DLN	30	0,37	0	0,30	0	R
34 <sup>a</sup>	75,20	1	20,30	1	DLN	22	1,00	1	0,75	0	R
31 <sup>b</sup>	1,02	1	1,24	1	DLN	51	0,81	0	0,66	0	R
40 <sup>c</sup>	0,70	0	1,17	1	DLN	51	0,78	0	1,00	1	D
34	0,70	0	0,55	0	DLN	29	0,79	0	1,45	1	D
47	0,44	0	0,70	0	DLN	35	0,52	0	0,73	0	D
36	0,37	0	0,30	0	DLN	35	0,43	0	23,56	1	D
31 <sup>a</sup>	0,56	0	0,37	0	DLN	34	0,47	0	0,57	0	D
44	0,59	0	0,49	0	DLN	37	1,18	1	0,65	0	D
35 <sup>b</sup>	0,73	0	0,59	0	DLN	39	0,46	0	1,20	1	D
43 <sup>c</sup>	0,79	0	0,80	0	DLN	21	1,00	1	0,15	0	D
						47	0,80	0	1,02	1	D
						39	1,03	1	0,26	0	D
						58	1,23	1	0,59	0	D

BR: bajo riesgo; AR: alto riesgo; Pap: resultado de la citología; DLN: dentro del límite de la normalidad; R: ASCUS reactivo; D: ASCUS displásico. Los superíndices indican las muestras iniciales y sus correspondientes controles en los casos positivos.

go clínico siguiendo el Sistema Bethesda<sup>4</sup>.

Las muestras para el estudio del VPH se recogen por medio de cepillo cervical, tras retirar el exceso de moco cervical con torunda de algodón o dacrón. El cepillo se inserta en el orificio cervicouterino a una profundidad de 1 a 1,5 cm, hasta que las cerdas externas más largas del cepillo tocan el ectocérvix; se gira el cepillo tres veces en sentido antihorario. Posteriormente, el cepillo se inserta en el fondo del tubo de transporte. Se utilizan cepillos y medios de transporte Digene Cervical Sampler® (Digene Corporation, Beltsville, MD, EE.UU.). Las muestras se transportan al laboratorio, donde se almacenan a una temperatura entre 2 y 8 °C.

En el laboratorio se realizan las pruebas para la detección de ADN viral del VPH en campana de flujo laminar. Se utilizan reactivos contenidos en el Digene Hybrid Capture® System-II (HC-II®) (Digene Corporation, Beltsville, MD, EE.UU.).

El método consiste en un ensayo de captura de anticuerpos ligados a sondas de ARN complementario del ADN viral del VPH, consiguiendo una señal amplificada que puede ser detectada por un lector quimioluminiscente (Digene DCR-1®; Digene Corporation, Beltsville, MD, EE.UU.) con capacidad de reconocer cualitativa o semicuantitativamente la presencia de 18 genotipos del VPH, 5 de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) y 13 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,

52, 56, 58, 59 y 68) para el desarrollo de cáncer de cuello de útero. Se obtiene una *ratio* por la división del recuento quimioluminiscente de cada muestra entre la media de los recuentos de los controles positivos. Se considera positiva una *ratio* mayor de 1. Asimismo se hacen controles negativos por triplicado para asegurar una calidad aceptable de la prueba.

Para validar estadísticamente los resultados se ha utilizado el programa informático SPSS-Win®, realizando los tests de la  $\chi^2$  y de la t de Student.

## RESULTADOS

De las 11.000 citologías, se obtuvieron los siguientes resultados: un 1,53% de ASCUS (1,1% de lesiones reactivas y un 0,43% probablemente displásicas); un 0,3% de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL/CIN 1); un 0,16% de lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL/CIN 2-3), mientras que tan sólo se halló un 0,02% (2 casos) de carcinoma invasivo.

El rango etario, para ambos grupos, se sitúa entre los 21 y 58 años, con una edad media de 39,5 años. Para el grupo DLN la edad media es de 38,4 años, mientras que en el grupo ASCUS la media fue de 44,4 años, si bien en ASCUS-D la media es de 37,4 años y para ASCUS-R es de 44 años. Por lo que se refiere a la edad según el estudio de VPH, se observa que la media para los positivos es de 35,6 años y en

**TABLA II. Correlación citología-hibridación/captura del virus del papiloma humano (VPH)**

CITOLOGÍA	N.º DE CASOS	HIBRIDACIÓN/CAPTURA HPV		
		HPV-	HPV BR+	HPV AR+
DLN	20	17 (20)	2 (0)	3 (0)
ASCUS-R	12	7	1	3
ASCUS-D	11	3	4	5
Total	43	27 (30)	7 (5)	11 (8)

DLN: en el límite de la normalidad; ASCUS-R: ASCUS reactivo; ASCUS-D: ASCUS displásico; BR: bajo riesgo; AR: alto riesgo. Entre paréntesis se indican los resultados en la segunda determinación.

las pacientes con prueba negativa es de 40,6 años.

En la tabla I se exponen los resultados obtenidos con la HC-II® en las 43 muestras, clasificadas en función del resultado de la citología previa, incluyendo la edad, la *ratio* obtenida con hibridación para los tipos de bajo y alto riesgo, y el resultado final de la prueba en forma de 1 para aquellas consideradas positivas (las cuales se han sombreado para mayor facilidad) y 0 para las negativas.

En el grupo DLN hemos destacado con superíndices los tres casos que presentaron cocientes positivos, con el objeto de compararlos con las tres muestras posteriores negativas.

En el otro grupo de estudio, ASCUS, analizamos 23 pacientes, de las cuales 13 tuvieron resultados positivos, repartidas en 4 para ASCUS-R y 9 para ASCUS-D, lo que supone un total del 56,5% de casos positivos. Al desglosar estos datos se observa que para el subgrupo ASCUS-D se obtiene un 81,8% de muestras con ADN viral y, sin embargo, en las lesiones reactivas es del 33%, diferencia que resulta estadísticamente significativa para una valor de  $p < 0,05$ .

En cuanto a la determinación del tipo de virus (alto/bajo riesgo), la mayor frecuencia es para los tipos de alto riesgo, en una proporción 11:7, no resultando significativa la diferencia hallada. De todos los análisis practicados únicamente en dos de ellos se ha encontrado ADN viral con genotipos de alto y bajo riesgo concomitante, que corresponden precisamente a los casos que luego negativizaron la prueba; en la tabla II se detallan los resultados desglosados.

## DISCUSIÓN

La infección por el VPH es el principal factor etiológico en el desarrollo de la neoplasia de cérvix. El mecanismo por el que el VPH contribuye a la progresión neoplásica es fundamentalmente a través de la acción de dos oncoproteínas virales llamadas E6 y

E7. Ambas forman complejos con reguladores muy importantes del ciclo celular, en particular con p53 y pRb, respectivamente, llevando a una disrupción de la maquinaria del ciclo celular y del proceso de reparación del ADN<sup>5</sup>.

A principios de 1990<sup>1</sup> se identificaron 62 tipos de VPH (actualmente se conocen nuevos tipos), de los que más de 20 se han encontrado en lesiones genitales. El 6, el 11 y el 42 se asocian con el condiloma acuminado y no se observan en el carcinoma invasivo, en tanto que los tipos 16, 18 y 31 se han encontrado en alrededor del 90% de los cánceres invasivos.

La hibridación demuestra directamente la presencia del ADN viral de células y tejidos<sup>2</sup>. Se requieren pruebas más específicas para investigar los diferentes tipos de VPH, pudiendo realizarse *in situ* sobre secciones o portaobjetos, o tras homogeneizar muestras de tejido. La infección por el VPH puede ser completamente asintomática. El grupo de Zur Hausen<sup>3</sup> encontró que el 10% de las pacientes asintomáticas eran portadoras del VPH, porcentaje que se eleva hasta el 30% en las embarazadas. De cualquier modo, cuando están ausentes todos los signos morfológicos del VPH y aun así el ADN viral está presente en las células, se debe asumir que hay muy pocas copias virales.

Desde el punto de vista del tratamiento, es preferible considerar todos los casos de infección por VPH como potencialmente peligrosos, y se debe recomendar la realización de una colposcopia con múltiples biopsias para confirmar el diagnóstico<sup>6,7</sup>. Todas las lesiones deberían ser erradicadas por láser, criocirugía o diatermia, ya que la exéresis de la lesión reduce significativamente la biomasa crítica del virus; de este modo, la defensa inmunológica de la paciente puede superar el virus remanente.

Recientemente, Shlai et al<sup>8</sup> han publicado un estudio que trata de predecir la neoplasia cervical intraepitelial de grados 2-3, usando el test del VPH en pacientes con atípia diagnosticada sobre extendidos citológicos. Sus conclusiones indican que el triaje del VPH resulta un método coste-efectivo alternativo a la colposcopia.

En el análisis de nuestros resultados se observa un porcentaje de lesiones atípicas en el test de Papanicolaou muy inferior a lo referido por otros autores<sup>9</sup>; esto se debe a que las muestras remitidas no corresponden a pacientes de alto riesgo para enfermedades de transmisión sexual. En cuanto a la incidencia del VPH en la población analizada, los resultados son similares a los descritos para lesiones no displásicas<sup>10</sup>.

La diferenciación entre ASCUS-D y ASCUS-R se ha establecido siguiendo las recomendaciones del Sistema Bethesda<sup>4</sup> 2001, que orienta las atípias escamo-

sas hacia un origen reactivo, debido a inflamación o reparación del epitelio, o bien alerta sobre una posible displasia incipiente, más cerca de una lesión tipo LSIL/CIN 1 (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado), con signos morfológicos indicativos, pero no definitivos de papilomavirus.

En aquellas pacientes con estudios negativos en la prueba de Papaniculaou, la carga viral está por debajo de la observada en las muestras con alteraciones morfológicas; por otro lado, en nuestra serie los tres casos que obtuvieron cocientes positivos con citología normal se normalizaron en controles posteriores. Esto parece indicar que la infección viral ha sido reciente y el genoma viral no se ha introducido en el genoma de las células cervicales, por lo que no se encuentran copias virales viables suficientes para perpetuar el virus. Todo ello nos lleva a considerar para estos casos que el doble estudio (test de Papanicolaou + HC-II®) es el método ideal para el seguimiento de estas pacientes asintomáticas, con el objeto de detectar posibles recidivas aun antes de que aparezcan alteraciones morfológicas evidentes.

Respecto al grupo ASCUS, ya se ha comentado la diferencia estadísticamente significativa entre ambos subgrupos, que obliga a reclasificar las tomas reactivas como probablemente displásicas, para así permitir su entrada en programas de seguimiento y control más estrictos, pues de otro modo no se beneficiarían del adecuado abordaje terapéutico y desembocarían, quizás, en lesiones de mayor grado, lo que ocasionaría un gasto económico y social inaceptable.

A pesar de que algunos autores<sup>11-14</sup> todavía cuestionan la validez de las técnicas de hibridación, el análisis de nuestros resultados y la revisión bibliográfica<sup>15-19</sup> indican que la técnica se encuentra en la actualidad lo suficientemente validada y consolidada para incluirla en los protocolos de diagnóstico y seguimiento del cáncer de cérvix, pudiendo formar parte de las guías de seguimiento<sup>6,20,21</sup> tras el tratamiento de neoplasias cervicales intraepiteliales a los 6, 12 y 24 meses.

Consideramos que la triple toma de Wied, complementada con la determinación del VPH por captura de híbridos, es en la actualidad el método idóneo para la detección de lesiones potencialmente malignas en el cérvix uterino. Asimismo la HC-II® ayuda a reorientar las lesiones tipo ASCUS hacia lesiones escamosas intraepiteliales (LSIL/CIN 1) que requieren un seguimiento más estrecho, aumentando la posibilidad de detectar recidivas tras el tratamiento.

## RESUMEN

La infección por el virus del papiloma humano

(VPH) es el principal factor etiológico en el desarrollo de la neoplasia de cérvix. El presente estudio se ha basado en el análisis del VPH a través de hibridación mixta y captura de secuencias específicas de ADN viral en muestras de pacientes con citología no displásica. Se han definido dos grupos en función del diagnóstico citológico: *a*) dentro de los límites de la normalidad (DNL), y *b*) atipias escamosas de significado indeterminado (ASCUS), dividiéndolo a su vez en ASCUS de probable origen reactivo (ASCUS-R) y probablemente displásico (ASCUS-D).

El 15% de las muestras no ASCUS-D (DNL + ASCUS-R) resultó positivo para VPH, mientras que en el 81% de los ASCUS-D se detectó VPH. En el grupo DNL se obtuvieron tres resultados positivos que en controles posteriores se negativizaron.

En conclusión, la detección del VPH por hibridación mixta es un método de gran utilidad en pacientes que, a pesar de contar con citologías no concluyentes de acción viral, presentan alta sospecha clínica para dicha infección. Asimismo, resulta una inestimable herramienta a la hora de reclasificar las citologías informadas como ASCUS, lo que orienta hacia una posible displasia y permite intensificar el control de estas pacientes. Consideramos que actualmente el mejor método de cribado del cáncer cervicovaginal se sustenta en el test de Papanicolaou apoyado en la determinación del VPH.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Weaver MG, Abdul-Karim FW, Dale G, Sorensen K, Huang YT. Outcome in mild and moderate cervical dysplasias related to the presence of specific human papillomavirus types [revisión]. *Mod Pathol* 1990;3:679-83.
2. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsague X, et al. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol* 2001;54:163-75.
3. De Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Munz F, Miklaw H, et al. Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities: results of a 5-year follow-up study. *Gynecol Oncol* 1992;44:33-9.
4. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. New York: Springer-Verlag, 1994.
5. Etherington I, Shafi M. Human papillomavirus and cervical screening. *Genitourin Med* 1996;72:153-4.
6. Nibbenhuis MA, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001;84:796-801.
7. Paraskevaidis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, Malamou-Mitsi V, Lolis ED, Kitchener HC. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 2001;84:796-801.

- helial neoplasia. *Obstet Gynecol* 200;98:833-6.
- 8. Shlay J, Dunn T, Byers T, Barón A, Douglas J. Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 using risk assessment and human papillomavirus testing in women with atypia on Papanicolaou smears. *Obstet Gynecol* 2000;96:410-6.
  - 9. Lee NW, Kim D, Park JT, Kim A. Is the human papillomavirus test in combination with the Papanicolaou test useful for management of patients with diagnoses of atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesions? *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1453-7.
  - 10. Menezes G, Euscher E, Schwartz B, Catania F, Chancellor J, Nuovo GJ. Utility of the *in situ* detection of HPV in Pap smears diagnosed as within normal limits. *Acta Cytol* 200; 45:919-26.
  - 11. Torné A, Ordi J, Puig-Tintoré LM, Jou P, Sánchez E, Muntane J, et al. Determinación del papiloma virus mediante hibridación *in situ*. Correlación clinicopatológica y virológica en pacientes con lesiones escamosas intraepiteliales del cérvix uterino. *Med Clin (Barc)* 1997;109:691-5.
  - 12. Torné A, Ordi J, Sánchez E, Puig-Tintoré LM. *Med Clin (Barc)* 1998;111:635-6.
  - 13. García-Díaz JD. Utilidad clínica de la detección del papillomavirus por hibridación *in situ* en las pacientes con lesiones escamosas intraepiteliales del cérvix uterino. *Med Clin (Barc)* 1998;111:635-6.
  - 14. Herbst AL, Pickett KE, Follen M, Noller KL. The management of ASCUS cervical cytologic abnormalities and HPV testing: a cautionary note. *Obstet Gynecol* 2001;98:849-51.
  - 15. Giannoudis A, Herrington S. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol* 2001;193:295-302.
  - 16. Bosch F, Manos M, Nuñez N, Sherman M, Jansen A, Peto J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
  - 17. Sanjosé S, Valls I, Cañadas MP, Lloveras B, Quintana J, Shah K, et al. Infección por los virus del papiloma humano y de la inmunodeficiencia humana como factores de riesgo para el cáncer de cuello uterino en mujeres reclusas. *Med Clin (Barc)* 2000;115:81-8.
  - 18. Cañadas MP, Martínez F, Sanjosé S, Valls I, Lloveras B, Bosch FX, et al. Detección del ADN del virus del papiloma humano por PCR en mujeres de alto riesgo. Validación de un protocolo. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1998;16:400-5.
  - 19. Jenkins D, Sherlaw-Jonhson C, Gallivan S. Assessing the role of HPV testing in cervical cancer screening. *Papillomavirus Rep* 1998;4:89-101.
  - 20. Ferris D, Wrught T, Litaker M, Richart R, Lorincz A, Sun X. Triage of women with ASCUS and LSIL on Papanicolaou smear reports: management by repeat Pap smear, HPV DNA testing, or colposcopy. *J Fam Pract* 1998;46:125-34.
  - 21. Nibbenhuis MA, Helmerhorst TJ, Van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 2001; 358:1782-3.