

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen
Volume 46

Número
Number 2

Abril-Junio
April-June 1999

Artículo:

Detección citológica de virus del papiloma humano y su correlación con PCR: Estudio prospectivo en 55 casos

Derechos reservados, Copyright © 1999:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Detección citológica de virus del papiloma humano y su correlación con PCR:

Estudio prospectivo en 55 casos

Palabras clave: Virus del papiloma humano, colposcopia, biología molecular, citología, PCR.

Key words: Human papillomavirus, colposcopy, molecular biology, cytology, PCR.

José de J Curiel Valdés,* Rafael Lozada Montes de Oca,** Jaime Berumen,*** Josefina Briones,* Arturo Catarino*

* Departamento de Patología, Sanatorio Notre Dame. México D.F.

** Clínica Lozada.

*** Escuela Médico Militar, Departamento de Biología Molecular, México, D.F.

Correspondencia:

José de J. Curiel Valdés

Hamburgo No. 304 col. Juárez

06600, México, D.F.

E-mail: jlcuriel@acnet.net

74

Resumen

Tradicionalmente la enfermedad por el virus del papiloma humano (VPH) en el cérvix uterino es detectada por el estudio citológico (Papanicolaou) y recientemente por la detección de la secuencia viral por varios métodos de biología molecular. Clínicamente esta enfermedad es detectada mediante colposcopia. Los criterios para diagnosticar citológicamente la infección por el VPH en una célula, están definidos y son muy rígidos con 20 a 40% de falsos negativos. En nuestro laboratorio hemos detectado pacientes con esta enfermedad mediante el estudio citológico con criterios más sutiles; algunos de estos cambios se conocen como pseudocoilocíticos. En 55 pacientes en las que se encontraron estos cambios sutiles, principalmente el refuerzo de la membrana citoplásmica, se les realizó la detección del virus mediante biología molecular por PCR. En 33 de ellas (60%) fue positiva la presencia del virus y adicionalmente en 10 casos más encontramos por colposcopia la corroboración de infección por el virus. De lo anterior concluimos que existen estos cambios más sutiles, que pueden ser usados para la detección del VPH y tienen 78.2% de correlación con la biología molecular y la colposcopia juntas, con sensibilidad de 100% y especificidad de 78.2%.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) disease is traditionally detected by cytological study of uterine cervix (Papanicolaou) and recently by viral sequence detection with several methods of molecular biology. This disease is clinically detected by colposcopy. There are very rigorous criteria to diagnose cytologically HPV infection in one cell, with 20 to 40% of false negative. In our laboratory, we have detected patients with this disease by means of cytological study with more subtle criteria; some of this changes are known as pseudokoilocytic ones. In 55 patients, in who subtle changes were found, mainly cytoplasmic membrane reinforcement, detection of the virus by molecular biology with PCR was carried out. We found in 33 of them (60%) the presence of virus was positive and in addition, 10 more cases we found by colposcopy the corroboration of virus infection. Whit basis on the above mentioned, we conclude the existence of these more subtle criteria which can be used for HPV detection, with correlation of 78.2% with molecular biology and colposcopy together, with a sensibility of 100% and specificity of 78.2%.

Introducción

La presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) condiciona lesión intraepitelial (LIE) en el cuello uterino, que puede ser de alto y de bajo grado de malignidad.¹⁻⁵ Los criterios citológicos de inclusión para el grupo de lesiones producidas por este virus y sus consecuencias han sido discutidos y definidos en el Sistema Bethesda (SB).⁶⁻⁸ En diversas series se reportan entre 20 a 40% de falsos negativos de estudios citológicos con relación a la colposcopia, la biopsia y la detección del virus por biología molecular.¹⁻⁵ En el SB se dividieron las lesiones del cuello uterino en dos grupos, las de bajo grado de malignidad (LIEB) y las de alto grado de malignidad (LIEA); además un grupo con alteraciones cuya naturaleza no es clara y que puede tener varios orígenes y por lo tanto la consecuencia de estas alteraciones no es definible y que se han denominado como atipia celular de significado incierto. Después de aplicar estos criterios, el número de lesiones diagnosticadas de bajo grado y las de significado incierto se ha triplicado, cuya etiología resulta ser en un porcentaje importante la infección por VPH;^{9,10} consecuentemente ha aumentado el número de lesiones que hay que estudiar para definir la conducta a seguir. La atipia celular de significado incierto y las lesiones de bajo grado de malignidad requieren un diagnóstico más preciso ya que se ha demostrado que cuando estas lesiones se someten a biopsia, en un número bajo (20%) pero significativo, son lesiones intraepiteliales de alto grado, es decir displasias de grado moderado a severo y carcinomas *in situ*.¹⁰⁻¹³

Las técnicas de biología molecular han sido extensamente utilizadas para detectar y subdividir los tipos de VPH en tres categorías: los de alta capacidad oncogénica, los de grado intermedio y los de baja capacidad oncogénica.¹⁻¹³ Se ha explorado también en estos estudios la posibilidad de utilizar las técnicas de biología molecular como un recurso para definir en las pacientes con atipia celular de significado incierto quiénes requieren de col-

poscopia y biopsia. También el papel de la colposcopia y la biopsia ha sido extensamente valorado.¹⁰⁻¹⁵ Se considera actualmente como estándares de oro a la biopsia y a la colposcopia para certificar la enfermedad por virus del papiloma. Citológicamente los casos aceptados por el SB como cambios coilocíticos necesitan ser totalmente típicos, es decir que el efecto citopático del virus debe ser expresado en su forma florida, dejando los cambios sutiles a un lado y tipificados como pseudocoilocitosis. Tanaka y cols.¹⁶ reportan cambios de coilocitosis, metaplasia epidermoide y otras alteraciones citológicas para diagnosticar enfermedad por VPH y las correlacionan con colposcopia, biopsia y técnicas de biología molecular; ellos obtienen un grado aceptable de correlación con la citología, inclusive interobservador. Existen, por otro lado, trabajos que niegan el valor de estos cambios pseudocoilocíticos; sin embargo, a pesar de ello sigue predominando en nuestro medio la discrepancia sobre cuál es el criterio citológico para diagnosticar el VPH y en la mayoría de los departamentos de citología en México se siguen los criterios rígidos del SB; sin embargo, en la práctica diaria muchos patólogos y citólogos utilizan estos términos y los denominan cambios sugestivos pero no concluyentes de infección por VPH. En nuestro laboratorio hemos utilizado estos criterios de pseudocoilocitosis pero limitados a varios cambios no tan rígidos como los del SB, ni tan ambiguos como los descritos en algunos trabajos.^{5,6,11,15} El propósito de esta comunicación es correlacionar estos criterios «sutiles» de la citología para diagnosticar el VPH con la detección del virus por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 55 casos de lesiones cervicales.

Material y métodos

Se incluyeron 55 pacientes cuya citología cérvico-vaginal inicial mostró cambios pseudocoilocíticos (sugestivos de VPH). El VPH se exploró mediante la técnica de PCR en una segunda toma, la cual se

realizó bajo exploración colposcópica, que aunque se comentan algunos hallazgos de esta exploración, la correlación con este método será discutida por separado en otra publicación. Los criterios de pseudocoilocitosis (*Figura 1*) utilizados para el diagnóstico citológico para VPH en nuestro laboratorio son:

- 1) Refuerzo hiper Cromático uniforme de la periferia del citoplasma de la célula, con mayor claridad en la tinción del resto del citoplasma, principalmente alrededor del núcleo. El núcleo puede no tener ningún cambio, sin embargo cualquier indentación o intento de lobulación del núcleo es tomado en cuenta como dato adicional;
- 2) Además la presencia de metaplasia queratinizante en las células endocervicales. Este último no fue utilizado como criterio único para diagnosticar VPH, sin embargo en casos de células aisladas con el criterio 1 y presencia de más de dos grupos de cinco células de metaplasia epidermoide queratinizante se consideró como positivo.

76

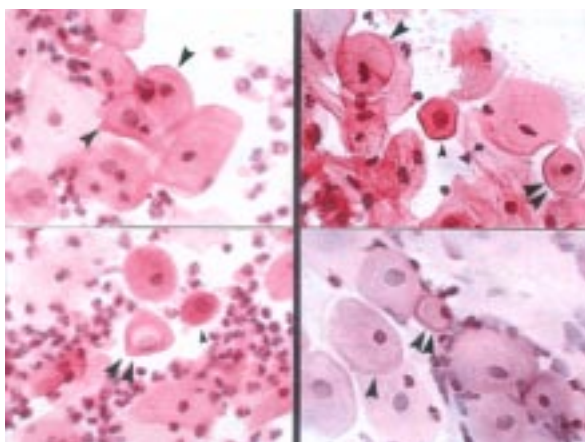


Figura 1. Cambios pseudocoilocíticos: flechas sencillas, células intermedias con cambios de refuerzo uniforme de la membrana citoplásmica de diversos grados, con leve palidez del resto del citoplasma, sin cambios nucleares. Doble fecha: los mismos cambios en células metaplásicas, en la del recuadro inferior izquierdo existe halo claro perinuclear, sin embargo no hay cambio en el núcleo. Flecha chica: células de metaplasia epidermoide queratinizante, en la del recuadro superior derecho existe también un discreto refuerzo de la membrana citoplásmica.

Cuadro I. Casos estudiados y técnica de laboratorio aplicada.

		%
Total	55	100
PCR positivos	33	60
Colposcopia positiva	43	78.2

Adicionalmente observamos que la mayor parte de las células con el criterio 1 fueron de tipo metaplásico.

Estos dos criterios son los incluyentes mínimos; desde luego todos los criterios del SB fueron tomados en cuenta y que son los clásicos de cambios coilocíticos.

La muestra para realizar PCR fue tomada con tres instrumentos: cepillo cervical, con brocha cervical y con hisopo. Inicialmente se removió el exceso de moco mediante un cepillo cervical sin rozar la superficie cervical; se utilizó primero la brocha, barriendo la parte exocervical y la zona de transformación; después el cepillo endocervical, y por último con el hisopo se raspa la parte exocervical y la zona de transformación de nuevo. La muestra de los tres instrumentos es colocada en una solución de extracción y guardada en refrigeración hasta su proceso. La detección de los VPH se hizo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos universales MY09/MY11,^{17,18} GP5+/GP6+(XXX) y LC1/LC2(XXX) y los virus se tipificaron por secuenciación, utilizando el método fluorescente con PCR y un analizador genético

Cuadro II. Tipos de virus de papiloma humano detectados por PCR en el grupo de 55 pacientes.

Tipo de virus	Núm. de casos
11	13
6	5
35	5
53	2
16, 26, 39, 42	1 cada uno
51, 57, 61, 62	1 cada uno

automático, como se ha descrito previamente.¹⁹ El estudio colposcópico se realizó mediante colposcopio Carl Zeiss, aplicando ácido acético al 4% y lugol utilizando los criterios habituales.^{20,21}

Resultados

De las 55 pacientes estudiadas por citología, 33 (60%) resultaron positivas para VPH (*Cuadro I*), cuyas variedades se presentan en el *cuadro II*. Adicionalmente por colposcopia al tomar la muestra se corroboró infección en 43 casos (78.2%) con lesiones típicas de VPH utilizando los criterios de lesiones acetoblanas elevadas cartográficas y de puntos blancos.

Comentarios: De los resultados obtenidos podemos deducir que los criterios «sutiles» utilizados en este trabajo para diagnosticar VPH citológicamente son válidos, tienen 21.8% de falsos positivos comparados con la colposcopia y PCR juntos y 40% comparados con PCR para VPH. En 10 casos con lesión colposcópica el PCR no detectó ningún VPH. Esta diferencia podría explicarse por deficiencia en la toma de la muestra, muestra insuficiente, nuevos tipos de virus no detectados por el procedimiento empleado o sobrediagnóstico en colposcopia. Sabemos de antemano que existen múltiples causas que alteran las células, dando morfológicamente cambios de pseudocilocitosis sugestivos de infección por VPH y que son inespecíficos. Es posible que algunos de estos cambios coincidan con la infección por VPH y realmente no sean efectos citopáticos del virus, sin embargo el margen de falsos positivos reuniendo la evidencia colposcópica y de PCR es de sólo 21.8%. La PCR es un método más sensible que la citología y se ha reportado la presencia de VPH en pacientes clínica y citológicamente sanas. En estos estudios los criterios para diagnosticar VPH son los estrictos clásicos.⁸ El estudio estadístico muestra que la sensibilidad de estos criterios sería de 100% y aunque el diseño de este estudio tiene algunas limitantes para establecer con certeza la especi-

ficidad, ésta se estimó en 78.2%. Sabemos que una paciente con estudio citológico anormal, en el cual están incluidas las de VPH y atipia celular de significado incierto tiene más posibilidades en los siguientes cinco años de presentar una lesión intraepitelial de alto grado,^{4,8} en relación con una paciente que no lo tiene; de ahí la importancia de reducir el número de estudios falsos negativos en la detección de VPH con estos criterios. Se podría seleccionar mejor a estas pacientes y seguirlas durante un lapso mayor de tiempo y así tener la posibilidad de detectar cuando el cambio preneoplásico ocurra; también es posible en estas pacientes realizar estudio de identificación y subtipificación de los virus para detectar los de alto riesgo y ejercer una vigilancia más estrecha. En este estudio los virus de alto riesgo fueron siete, los de riesgo intermedio ocho, y los de bajo riesgo 18, lo cual es semejante a lo encontrado en otras series.^{1,4,8} Es importante tener en cuenta estas variaciones morfológicas, ya que el SB es un conjunto de criterios susceptibles de perfección y seguramente en un futuro se le harán enmiendas de algún tipo que contemplen cambios más sutiles y que puedan ser identificados de lesiones inflamatorias no relacionadas con el virus.

Bibliografía

1. Bosh FX, Manos M, Muñoz N, Sherman M, Jansen M, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Can Inst* 1995; 87(11): 796-802.
2. Schiffman MH, Brinton LA. Epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995; 76(suppl.): 1888-1901.
3. Richart R. Screening, The next century. *Cancer* 1995; 76(suppl.): 1919-1927.
4. Ferenzi A. Management of patients with high grade squamous intraepithelial lesions. *Cancer* 1995; 76(suppl.): 1928-1933.
5. Wright TC, Sun XW, Koulos J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low-grade cytologic abnormalities. *Obst & Gyn* 1995; 85: 202-210.
6. *The 1991 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses*. Developed and approved at the National Cancer Institute Workshop, April 1991: 29-31.
7. Kurman RK, Solomon D. *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy*. New York: Springer-Verlag, 1994.

8. Crum CP. Genital papillomaviruses and related neoplasms: Causation, diagnosis and classification (Bethesda). *Short Course Modern Path* 1994; 7: 138-145.
9. Morrison EA, Ho GY, Vermund SH et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia, a case control study. *Int J Cancer* 1991; 49: 6-13.
10. Ferenczy A. Viral testing for genital human papillomavirus infections: recent progress and clinical potentials. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5: 321-328.
11. Cox TJ, Schiffman MH, Winzelberg A, Patterson J. An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to colposcopy clinics. *Obs & Gyn* ; 80: 389-395.
12. Cox TJ, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid captures appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 946-954.
13. Sheman ME, Schiffman MH, Lorincz AT, Manos MM, Scott DR, Kurman RJ, Kiviat NB, Stoler Mark, Glass AG, Rush BB. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology. Correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high-risk human papillomavirus types.
14. Escobedo GA, Ruz CV, Once AM, Diaz ZP. Correlación diagnóstica por colposcopia, Papanicolaou y biopsia de cérvix: Estudio prospectivo. *Rev Med Hospital de la Mujer* 1995; 5: 75-78.
15. Prasad CJ, Genest DR, Crum CP. Nondiagnostic squamous atypia of the cervix (atypical squamous epithelium of undetermined significance): Histologic and molecular correlates.
16. Tanaka H, Chua KL, Lind E, Hjerpe A. Patients with types of human papillomavirus: covariation and diagnostic relevance of cytological findings in Papanicolaous smears. *Cytopathology* 1993; 4: 273-283.
17. Berumen J, Unger ER, Casas L, Figueroa P. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Human Path* 1995; 26: 1-6.
18. Manos MM, Ting Y, Wrigt DK et al. The use of polimerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Furth M, Graves MF (eds). *Molecular diagnostics of human cancer*. Cold Spring Harbord NY: Cold Springs Harbord press, 1989: 209-214.
19. Casas L, Galván SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in E2 gene and are high amplified in cervical carcinomas. *Int J of Cancer* (1999) in Press.
20. Burghardt E. *Colposcopy-cervical pathology texbook and atlas*. 2nd ed. New York: Thieme Med Publishers 1991.
21. De Palo G. *Colposcopia y patología del tracto genital inferior*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1992.