Diagnostico integral de infección por HPV

11 min.

El Virus del Papiloma Humano (HPV) es el causante de la enfermedad de transmisión sexual con mayor incidencia en el mundo, está presente en casi el 100 % de los cánceres de cérvix y es el segundo cáncer más frecuente en la población femenina. Su detección y tipificación en muestras biológicas se realiza exclusivamente por técnicas de biología molecular debido a que el cultivo y propagación in vitro son impracticables y los métodos serológicos poco sensibles. La citología (únicamente) es poco sensible (50-70 %) en la detección de estas lesiones pero el uso combinado con la detección de ADN eleva este porcentaje a casi el 100 %. Son los estudios de ADN de HPV los que permiten la estratificación de las lesiones, orientar la conducta terapéutica y evaluar el pronóstico. Estos reducen el número de colposcopias y biopsias innecesarias. Sin embargo la metodología para control de calidad y evaluación del comportamiento analítico de estos nuevos ensayos está aún poco estandarizada. MANLAB ofrece todos los estudios necesarios para llegar al diagnóstico de la infección por HPV, incluyendo las pruebas de screening, principales métodos en uso para su diagnóstico.

Dr. Daniel Pirola
Responsable Área Virología
MANLAB

E-mail:
medicinagenomica@genesis-manlab.com.ar

MANLAB ofrece todos los estudios necesarios para llegar al diagnóstico de la infección por HPV, incluyendo pruebas de screening:

- HC2 Digene-Qiagen por técnica de Captura de Híbridos
- Detección de DNA/HPV por PCR y posterior identificación del subtipo viral por técnica de Secuenciación ABI 3100.
- Detección de ARNm de E6 y E7 para genotipos prevalentes de alto riesgo con metodología Nuclisens EasyQ HPV.

El virus

El Virus del Papiloma Humano (HPV) pertenece a la familia Papillomaviridae. Este virus posee un genoma de ADN de doble cadena de aproximadamente 8000 pares de bases de forma circular, no poseen envoltura y la simetría de la cápside icosaédrica.

Existen numerosas especies de HPV, su clasificación se realiza en base a la homología de la secuencia de ADN en tipos virales. Se han identificado no menos de 100 tipos diferentes de los cuales se agrupan en 16 grupos denominados en letras de A a P de acuerdo a su similitud. Asimismo pueden clasificarse de acuerdo al tropismo por epitelios específicos susceptibles en HPV cutáneos y HPV mucosos, dentro de este último grupo se encuentran los HPV asociados al Cáncer Cervical o Cáncer de Cuello Uterino.

El virus codifica dos tipos de proteínas, las estructurales o tardías que forman su cápside: L1 y L2 y las proteínas de expresión temprana: E1 a E8.

La infección por HPV se adquiere por contacto directo y es en general especie específica. El HPV causa la enfermedad de transmisión sexual con mayor incidencia en el mundo y en algunos grupos hasta el 80 % de la población sexualmente activa se ha infectado con un tipo de HPV. En muchos casos pueden coexistir infecciones con múltiples tipos virales.

El HPV está presente en casi el 100 % de los cánceres de cérvix, este a su vez es el segundo cáncer más frecuente en la población femenina. Solo en el 10 % de las infecciones por el HPV este es eliminado por el sistema inmune por lo que un número significativo de infecciones persistentes progresan a estadios pre cancerosos (SIL 2 y 3, lesión escamosa intraepitelial) y cancerosos.

Los HPV infectan y se replican en el epitelio escamoso de piel originando verrugas y en los epitelios mucosos donde producen papilomas benignos o en el caso de la mucosa anogenital condilomas acuminados y planos y displasia y neoplasia intraepitelial cervical. El tropismo celular depende del tipo de HPV por lo que cada una de estas lesiones están asociadas a uno

o más tipos específicos de HPV según se observa en la tabla 1.

Tabla 1: HPV y la enfermedades asociadas según el genotipo

Enfermedades asociadas	HPV tipos más importantes
-Verrugas plantares	1, 2, 4
-Verrugas comunes	2, 1, 7
-Epidemodysplasia verruciformis	5, 8
-Papilomatosis respiratoria recurrente	6, 11
-Condilomas acuminados (verrugas genitales)	6, 11, 42, 43
-Neoplasia intraepitelial cervical de bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31
-Neoplasia intraepitelial cervical de alto riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 45
-Carcinoma cervical	16, 18, 31, 33, 35, 45

Los tipos HPV 1,2 y 7 son responsables de las verrugas comunes de piel y los tipo 1 y 2 de las verrugas plantares. En el caso de las lesiones anogenitales el 90 % de las verrugas genitales (condilomas acuminados) son causadas por los HPV 6 y 11 en tanto las lesiones en cérvix están asociadas en el 70-80 % de los casos a los HPV 16 y 18. El virus induce proliferación celular que se manifiesta en las alteraciones histológicas. Por el efecto citopático del virus sobre la célula esta adquiere aspectos citomorfológicos característicos. Los coilocitos son queratinocitos hipertrofiados con halos transparentes que rodean al núcleo celular producto de esta acción viral. Estas células pueden detectarse con facilidad en los frotis de células coloreados con la tinción de Papanicolaou y son patognomónicos de la infección viral.

La capacidad oncogénica del HPV ha sido extensamente estudiada y el ADN viral se encuentra tanto en tumores benignos como malignos de mucosas conocidos como papilomas. No todos los HPV poseen el mismo potencial oncogénico. Los HPV con tropismo por mucosas pueden clasificarse de acuerdo a su asociación con cáncer cervical y lesiones pre canceroso en HPV de alto riesgo y HPV de bajo riesgo o no oncogénico. (Ver Tabla 2).

Tabla 2: Genotipos de alto y bajo riesgo

Genotipos según el riesgo de progresión	HPV tipos más importantes
Bajo Riesgo	6, 11, 42, 43
Alto riesgo	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82

En las células transformadas o cancerosas el virus HPV se encuentra generalmente integrado al genoma celular y el mecanismo de acción del virus sobre el genoma y metabolismo celular ha sido claramente establecido. Al momento de la ruptura del genoma circular para su integración al genoma celular es posible que los genes E1 y especialmente E2 queden inactivados pues su secuencia codificante se desorganiza. Esta inactivación de la E2 lleva al aumento de la expresión de E6 y E7. Tanto E6 como E7 pueden incluirse en el grupo de proteínas oncogénicas por su capacidad de unirse o inactivar a proteínas supresoras del crecimiento celular, específicamente las proteínas p53 y p105RB respectivamente.

El tipo de virus HPV, la carga viral, las coinfecciones múltiples y la integración viral son factores que afectan la relación virus-hospedador y tienen un papel importante en la evolución de la enfermedad asociada al HPV. Muchas pacientes que tienen resultados positivos en ensayos de ADN HPV tiene biopsias normales y no evolucionan tumores malignos aún cuando la infección es por tipos virales de alto riesgo.

Detección y tipificación

La detección y tipificación del virus HPV en muestras biológicas se realiza exclusivamente por técnicas de biología molecular dado que el cultivo y propagación in vitro son impracticables y los métodos serológicos poco sensibles. Los ensayos inmunológicos para detectar las proteínas del virus en células y tejidos son también inadecuado y pocos sensibles.

Los ensayos basados en técnicas moleculares para detectar ADN de HPV son de utilidad por si o combinados con los estudios citológicos para determinar el riesgo de pacientes con ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) o LSIL (lesiones intraepiteliales de bajo grado) presentes en cérvix. La citología únicamente es poco sensible (50-70 %) en la detección de estas lesiones pero el uso combinado con la detección de ADN eleva este porcentaje a casi el 100 %.

Los estudios de ADN de HPV permiten la estratificación de las lesiones, orientar la conducta terapéutica y evaluar el pronóstico. Reduce el número de colposcopias y biopsias innecesarias. Sin embargo la metodología para control de calidad y evaluación del comportamiento analítico de estos nuevos ensayos está aún poco estandarizada.

Los principales métodos en uso

DIAGNOS MED S.R.L.
Conesa 859 (C1426AQR) CABA
Tel. 011 4552-2929 (Rot.) - Fax 011 4551-5296
info@diagnosmed.com - www.diagnosmed.com

25 (OH) Vitamina D total automatizable en instrumentos de química clínica (Diazyme www.diazyme.com)

www.diasource-diagnostics.com
DIA Source
- 1,25(OH) 2 Vitamina D, RIA CT
- 25 (OH) Vitamina D total (D2 + D3) elisa y proximamente ria fase sólida
- 25 (OH) Vitamina D3 ria fase sólida

full spectrum cell analysis
eBioscience Immunoassays
www.ebioscience.com
We have your solution...
Bead-Based Multiplexing
- FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System
- Comprehensive, Validated ELISA
- Platinum ELISA Kits
- Instant ELISA® Kits
- High Sensitivity ELISA Kits Coat-It-Yourself ELISA Products
- Ready-SET-Go!® ELISA Sets
- Ready-SET-Go!® ELISPOT
- ELISA Antibodies & Recombinants
- Cytokine elisa kits Th 17 Cell products.

www.diazyme.com www.elisa.co.uk www.molecularmd.com www.biovision.com www.insitus.com www.alpco.com www.salimetrics.com www.quidel.com www.rsrltd.com www.bendermedsystems.com www.raybiotech.com

para el diagnóstico son:

a.- Sistemas de amplificación de la señal conocidos como captura de híbridos (HC2 Digene, Qiagen). Es un inmunoensayo no radiactivo basado en la hibridación del HPV presente en la muestra clínica a sondas de ARN. Los híbridos ADN-ARN son luego detectados usando un anticuerpo específico y un sistema de quimioluminiscencia de alta sensibilidad. Pueden utilizarse mezclas de sondas para alto riesgo (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) y bajo riesgo (HPV 6, 11, 42, 43, 44). Este método, el primero aprobado para uso de diagnóstico in vitro por FDA (Food and Drug Administration, USA), es ampliamente utilizado como screening en todo el mundo por su robustez, reproducibilidad y posibilidad de automatización. Entre las limitaciones se encuentran su sensibilidad (5000 copias de genoma viral) que es menor a la de las técnicas de PCR y cierta reactividad cruzada para algunos tipos virales lo que reduce su especificidad. El sistema HC2 presenta ventajas operativas relativas a su simplicidad, resultados en el día, mínimos requerimientos de muestras y alta correlación clínica. La mayor sensibilidad de los test de PCR (10 a 400 copias según los ensayos) puede ser contraproducente detectando infecciones transitorias sin significación clínica o que por sí misma sean eliminadas sin llegar a ser persistentes.

b.- Sistemas basados en la amplificación de la secuencia del ADN viral. La técnica de PCR (técnica de la polimerasa en cadena) es el método más ampliamente utilizado debido a su sensibilidad. Tradicionalmente se uso la metodología convencional pero actualmente los sistemas comercialmente disponibles están migrando hacia la variante de PCR en tiempo real (El ensayo Cobas HPV, Roche Molecular Diagnostics, detecta a los genotipos de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68).

Existen numerosas variantes metodológicas que pueden agruparse en dos grandes estrategias: 1.- PCR tipo específicas usando primers específicos de cada tipo de HPV. Esta estrategia es poco usado con fines clínicos porque es muy laboriosa y costosa por la cantidad de tipos de HPV existentes y 2.- la utilización de primers de amplio espectro que amplifican a la gran mayoría de los tipos virales basándose en regiones altamente conservadas (primers My09/MY11 y GP5+/6+). Luego de este paso de detección es necesaria la identificación del tipo viral presente. Nuevamente diversos métodos se pueden aplicar en esta etapa: 2.1 hibridación reversa en nitrocelulosa (Linear Array Roche Molecular Diagnostics o HPV LIPA v2, Innogenetics), 2.2 análisis de los fragmentos originados por enzimas de restricción (RFLP) y 2.3 secuenciación.

2.1 La hibridación reversa sobre nitrocelulosa utilizando sondas de captura es un método muy sensible para todos los genotipos incluidos, pero dada la gran cantidad de tipos existente solo los más prevalentes se incluyen en el diseño del ensayo. Permite detectar infecciones múltiples en un solo ensayo y es metodológicamente sencillo. Como desventaja presenta la hibridación cruzada entre tipos virales muy relacionados. El ensayo Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics) detecta 37 tipos de alto y bajo riesgo (HPV tipos 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39, y CP6108). Incluye a aquellos que causan HSIL (lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado) y cáncer cervical. El ensayo InnoLIPA HPV extra detecta los tipos de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 y también otros de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 44, 54, 70, 69, 71, 74. -

2.2 Respecto a RFLP es un método muy laborioso basado en el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos por tratamiento del producto de la amplificación con un conjunto de enzimas de restricción en forma individual. El patrón es difícil de identificar en caso de mutaciones puntuales.

2.3 El análisis de la secuencia es el método "gold standard" para la identificación del tipo de HPV permitiendo la identificación de la totalidad de los tipos descriptos, posibles mutaciones existentes y tipos no caracterizados o reportados recientemente. Es relativamente laboriosa y costosa por lo que requiere personal experimentado en el procedimiento. Los métodos de secuenciación tradicional basados en el método de Sanger no permiten en un solo test el análisis de infección múltiple. Existen métodos más modernos de secuenciación (pirosecuenciación y secuenciación 454) que permiten integrar múltiples primers de secuenciación en un solo ensayo.

c.- Otra estrategia actualmente en uso es la detección de ARNm de las proteínas E6 y E7 específicas de los genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 45). Nuclisens EasyQ HPV, Biomerieux). Este ensayo solo brinda información respecto a las infecciones en donde se expresan estos oncogenes virales y proporciona información clínicamente relevante en este aspecto dado que en el ciclo del virus HPV la sobreexpresión de E6 y E7 es el punto crítico desde el punto de vista molecular que lleva al cáncer de cérvix. La significación de un test positivo o negativo es por lo tanto diferente a los ensayos de detección descriptos anteriormente pero de alto valor clínico.

En conclusión existen variadas metodologías para detectar y genotipificar a los HPV presentes en muestras obtenidas para citología o biopsias. Todas presentan ventajas y desventajas diferenciales. Existen esfuerzos internacionales coordinados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) para mejorar la estandarización metodológica, establecer protocolos de evaluación comparativos, proveer estándares trazables de los diferentes tipos virales, establecer laboratorios de referencia y desarrollar programas de control de calidad externos.

Resumen de conceptos

- El cáncer cervical es causado por la infección persistente del virus HPV (aún existen factores secundarios necesarios).
- El riesgo de cáncer cervical está relacionado al tipo de HPV presente.
- Los HPV-16 y 18 están particularmente asociados al riesgo de cáncer y representan según las regiones aproximadamente el 70-80 % de los casos.
- Otros tipos de HPV son responsables de los restantes casos, algunos ejemplos: HPV-31, HPV-33 y HPV45.
- La distribución geográfica de los tipos de HPV no es uniforme.
- Existen diferentes metodologías para la detección y genotipificación, resta aún una mayor estandarización metodológica.
- Las vacunas existentes protegen principalmente contra los tipos HPV-16 y HPV-18 de entre los de alto riesgo.