

Normalización de un método inmunoquímico para detectar Papilomavirus humano tipo 16 en lesiones cérvico-uterinas

Standardization of immunochemical method for detection of type 16 human papillomavirus in cervix uterine lesions

Griselda Torres López,^I Yudira Soto Brito,^I Virginia Capó de Paz,^I Ledy Xiomara López Fuentes,^I Ana Isabel de la Torre Jiménez,^{II} Adibel Goicolea Maiza,^{III} Daniel Limonta Velázquez,^I Anny Pérez Rodríguez,^{II} Anamays Govín Chávez,^I Luis Morier Díaz,^I Yamira Caballero Lorenzo,^I Hermis Rodríguez Sánchez,^I Rosa Irene Álvarez Goyanes,^{IV} Adanays Calvo Pérez,^{IV} Xiomara Escobar Pérez,^{IV} Celia María Limia León,^I Vivian Kourí Cardellá^I

^I Departamento de Anatomía Patológica, Departamento de Virología, Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual, Departamento de Virología, Laboratorio de Producción, Departamento de Aseguramiento Científico-Técnico, Laboratorio de Cultivo de Células. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Departamento de Patología de Cuello, Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Ginecobstétrico "Ramón González Coro". La Habana, Cuba.

^{III} Departamento de Patología de Cuello. Hospital Ginecobstétrico "Eusebio Hernández". La Habana, Cuba.

^{IV} Departamento de Biología Celular y Banco de Muestras Biológicas. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la infección por Papilomavirus Humano (PVH) es la condición necesaria para la aparición y desarrollo del cáncer cérvico-uterino. Los genotipos de alto riesgo oncogénico son los causantes de este tipo de neoplasia y dentro de ellos el más frecuente es el PVH 16, que se encuentra aproximadamente en el 60 % de los casos. Los métodos de diagnóstico comerciales resultan costosos para países con escasos recursos económicos, lo que sugiere la búsqueda de alternativas empleando protocolos sencillos y baratos.

Objetivos: normalizar un método inmunoquímico para la detección del antígeno L1 de PVH tipo 16 en muestras cérvico-uterinas de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas y determinar la coincidencia entre el método normalizado y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR), como técnica de referencia, para estimar la utilidad de dicho método en el diagnóstico de la infección por este genotipo viral.

Métodos: se compararon tres procedimientos de inmunotinción (Indirecto de inmunoperoxidasa en dos pasos, Estreptavidina-Biotina y Amplificación por polímero) respecto a sensibilidad analítica, tinción inespecífica de fondo y tiempo de terminación, para la detección de la proteína L1 de PVH 16 en líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales humanos y en muestras cérvico-uterinas utilizadas como controles. El protocolo normalizado se aplicó a muestras cérvico-uterinas de mujeres entre 30 y 59 años, 82 con lesiones intraepiteliales cervicales y 10 sin antecedentes de alteraciones citológicas, a las que además se les determinó PVH 16 mediante RCP-TR.

Resultados: el procedimiento de Estreptavidina-Biotina resultó el más sensible y específico. La coincidencia entre el método inmunoquímico y la RCP-TR fue de un 98,6 %, la sensibilidad fue de un 98,57 % y la especificidad de un 91,67 %, con valores predictivos negativo y positivo por encima del 90 %.

Conclusiones: se demostró la validez del método inmunoquímico como prueba confirmatoria de la infección por PVH 16. Dicho método probó ser sensible, sencillo y no requiere de una compleja infraestructura para detectar PVH 16 en muestras cervicales. Además, esta técnica permite obtener información rápidamente y evita el uso de métodos invasivos.

Palabras clave: PVH, Proteína L1, lesiones intraepiteliales cervicales, Inmunohistoquímica, Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

ABSTRACT

Introduction: Human Papillomavirus (HPV) infection is the necessary condition for the occurrence and development of cervical cancer. The high oncogenic risk genotypes are the responsible for this type of neoplasia and the most frequent is HPV 16 that affects roughly 60 % of cases. Commercial kits for HPV detection are expensive for resource-poor countries, which suggests the search for alternative through non-expensive simple protocols.

Objectives: to standardize an immunochemical method for the detection of HPV 16 L1 antigen in cervical samples of patients with squamous intraepithelial lesions and to determine the diagnostic coincidence between the immunochemical method and the real-time polymerase chain reaction to estimate the usefulness of this method for the detection of cervical infection with this viral genotype.

Methods: three immunostaining methods (Two-Step Indirect Immunoperoxidase, Labelled Streptavidin-Biotin and Enhanced Polymer) were compared in terms of analytical sensitivity, nonspecific background staining and time of completion, for the detection of protein L1 of HPV-16 in a cell line derived from human cervical carcinoma and clinical samples from uterine cervix. The optimized protocol was applied to 82 cervical samples from women aged 30-59 years with squamous intraepithelial lesions and to 10 samples of sexually active women without previous signals of positive cytology. The presence of type 16 HPV was also detected with the aid of RT-PCR.

Results: the Streptavidin-Biotin system was the most sensitive and specific. The diagnostic agreement between the immunochemical method and the real-time polymerase chain reaction reached 98.6 %, sensitivity was 98.57 % and specificity was 91.67 %, with positive and negative predictive values above 90 %.

Conclusions: the validity of the immunochemical method as a confirmatory test for infection by HPV-16 has been demonstrated. The normalized immunochemical method proved to be a sensitive, simple, relatively fast method to detect HPV from clinical samples of cervical cells. Furthermore, this method provides information quickly, avoiding the use of invasive methods in patients.

Key words: HPV, L1 protein, cervical intraepithelial lesions, immunohistochemistry, real-time polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

Los Papilomavirus Humanos (PVH) constituyen una causa necesaria en el desarrollo del cáncer cérvico-uterino.¹ Estos virus infectan células epiteliales de la capa basal, ya sea en piel o mucosas. Los genotipos con alto potencial oncogénico están asociados a más del 99,7 % de las neoplasias cervicales invasivas, siendo el PVH 16 el genotipo con mayor incidencia a escala mundial.² Las lesiones del epitelio cervical pueden ser detectadas por citología, análisis histológico o por observación colposcópica. Estos métodos de diagnóstico son importantes en la evolución clínica de las pacientes. Por otra parte, los métodos moleculares de detección viral que permiten identificar los genotipos de PVH de alto riesgo (PVH-AR) en las lesiones cervicales, ofrecen la capacidad de establecer una asociación entre genotipos virales específicos, las lesiones en la mucosa cervical y su pronóstico.³ Sin embargo, la posibilidad de extender estas técnicas a la pesquisa poblacional en Cuba, es limitada por su costo.⁴

A pesar de que el programa para el diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino ha resultado en una reducción sustancial de la incidencia de este tipo de cáncer en Cuba, dicha patología continúa siendo una importante causa de muerte en mujeres en edad reproductiva.⁵ Por lo tanto se hace necesario emplear otros métodos de diagnóstico confirmatorio, más sensibles que la citología, que detecten proteínas o ADN de PVH, que además resulten factibles de aplicar a estudios poblacionales desde el punto de vista económico y que aporten nuevos datos con respecto a la situación de la infección por PVH en mujeres cubanas.

El objetivo del presente trabajo fue normalizar un método inmunoquímico para la detección del antígeno L1 de Papilomavirus Humano (PVH) tipo 16 en muestras cérvico-uterinas de pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas así como determinar la coincidencia entre el método normalizado y la RCP-TR, como técnica de referencia, para estimar la utilidad de dicho método en el diagnóstico de la infección por este genotipo viral.

MÉTODOS

Método inmunoquímico para la detección *in situ* del antígeno L1 de PVH 16

Para la normalización del método inmunoquímico se evaluaron tres procedimientos de inmunotinción descritos previamente en la literatura: Método Indirecto de Inmunoperoxidasa en dos pasos, Estreptavidina-Biotina (LSAB, del inglés, labelled streptavidin-biotin) y Amplificación por Polímero (ANACROM DIAGNÓSTICOS, MAD-041880QK-U, España).⁶ Dicho método se aplicó a los controles empleados: las líneas celulares derivadas de carcinoma cervical humano y las muestras clínicas definidas previamente como positivas o negativas a PVH 16 por RCP-TR.⁷ Los tres procedimientos de inmunotinción se compararon en cuanto a sensibilidad analítica (medida como intensidad de la inmunotinción), tinción inespecífica de fondo y tiempo consumido en la realización de la técnica. Al mismo tiempo se optimizaron dos pasos internos del método inmunoquímico: el desmascaramiento antigénico (enzimático o térmico) y la dilución óptima de trabajo del anticuerpo primario anti-L1 de PVH 16.

Líneas celulares y muestras clínicas

Líneas celulares

Se empleó la línea de carcinoma cervical humano (American Type Culture Collection, ATCC) transformada por PVH, SiHa con 1-2 copias del genoma de PVH 16 (ATCC, HTB 35, Rockville, Md) (7). Como control negativo se utilizaron células de fibroblastos humanos (ATCC, CCL 171).

Controles

Como controles para la infección por PVH se utilizaron muestras de células cérvico-uterinas frescas y fragmentos de tejido de igual localización, fijados en formol y embebidos en parafina (FFEP) procesados en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Dichos controles fueron definidos como positivos o negativos al agente viral según metodologías publicadas con anterioridad.^{7,8}

Muestras clínicas

Se analizaron muestras de células endo- y exo-cervicales obtenidas mediante raspados realizados a 82 pacientes con citología positiva. De estas pacientes se obtuvieron, además, muestras de cuello uterino FFEP obtenidas por conización, para su estudio histopatológico. Dichas muestras se diagnosticaron como lesiones intraepiteliales cervicales de alto y bajo grado (HSIL, del Inglés *High-grade squamous intraepithelial lesions* y LSIL, del Inglés *Low-grade squamous intraepithelial lesions*), según el sistema Bethesda.⁹ Se incluyeron células del epitelio endo- y exo-cervical provenientes de diez mujeres con citología negativa. Los diagnósticos citológicos e histológicos fueron realizados en el Departamento de Anatomía Patológica de los hospitales "Ramón González Coro" y "Eusebio Hernández". El diagnóstico para PVH en todas las muestras clínicas se realizó por RCP-TR mediante protocolos publicados previamente.^{7,10}

Procesamiento de las muestras para las técnicas inmunoquímicas

Los raspados celulares se procesaron según protocolos publicados previamente.¹¹ A partir de las muestras de tejido cérvico-uterino embebido en parafina se efectuaron cortes histológicos de 4 µm de espesor, que se colocaron sobre láminas silanizadas. Los cortes histológicos se desparafinaron y rehidrataron según protocolos estándares.^{6,11,12}

Procedimiento de inmunotinción

Los cortes de tejidos y extendidos celulares empleados como controles, se sometieron a dos métodos de desenmascaramiento antigénico. Uno de ellos consistió en la digestión proteolítica con una solución de tripsina al 0,05 % y cloruro de calcio al 0,1 % pH 7.8, por 20 minutos a 37 °C. El otro método empleado fue la recuperación antigénica por calor en baño térmico (Fisher Scientific Polystat 24, Bélgica) 30 minutos a 95 °C en tampón citrato 10 mM pH 6.0. Las láminas se trataron posteriormente con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,5 % y metanol absoluto durante 15 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Los sitios de uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA), al 5 % en TBS-T durante 30 minutos. Como anticuerpo (Ac) primario se utilizó el anticuerpo monoclonal (AcM) anti-L1 PVH 16 (Chemicon International INC, CBL402, EUA). La dilución apropiada se determinó mediante el análisis de las diluciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 y 1:1000. Las muestras se incubaron 16 horas, a 4 °C en presencia del Ac primario.

Se emplearon tres métodos de inmunotinción en los que se varía el Ac secundario utilizado. El Método Indirecto de Inmunoperoxidasa en dos pasos, en el que se utilizó como Ac secundario inmunoglobulina de conejo anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako Cytomation, P0260, Dinamarca). En el método LSAB se utilizó como Ac secundario inmunoglobulina de cabra anti-ratón biotinilada (Dako Cytomation, Dinamarca) y el complejo estreptavidina-HRP (Dako Cytomation, Dinamarca). En el Método de Amplificación por Polímero la inmunotinción se realizó utilizando los reactivos del estuche comercial MASVISION UNIVERSAL POLIVALENTE (ANACROM DIAGNÓSTICOS, MAD-041880QK-U, España) según las instrucciones estrictas del fabricante.

Se utilizaron controles internos del procedimiento de inmunotinción para determinar la calidad de la fijación e inclusión de los tejidos en parafina, así como la funcionalidad de los reactivos empleados, según protocolos publicados previamente.¹³ La presencia del antígeno viral L1 de PVH 16 se determinó previamente en los controles mediante el método inmunoquímico optimizado. Se utilizó la RCP-TR como técnica de referencia para medir la eficiencia del método normalizado.

Interpretación de las pruebas inmunoquímicas

Para la lectura inmunoquímica se siguió un protocolo a doble ciegas y se realizó una clasificación de acuerdo a la inmunoreactividad nuclear, citoplasmática y/o en la membrana celular. Las muestras fueron diagnosticadas según la siguiente estratificación: 0 Nula o negativa, + Débil o dudosa, ++ Moderada, +++ Intensa, de acuerdo a la intensidad y al área abarcada por el depósito del precipitado color marrón que ocurre donde se encuentra el antígeno detectado. Se consideró positiva una señal igual o mayor de dos cruces.¹⁴ La tinción inespecífica de fondo se evaluó siguiendo los mismos parámetros.

Análisis estadístico

Los indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño de la técnica inmunoquímica se calcularon mediante el empleo del paquete estadístico EPIDAT 3.1 para el Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados. Así se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, índice de validez de la prueba diagnóstica y los valores predictivos positivo y negativo.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Revisión de Ética Médica del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y de los hospitales ginecobstétricos. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes para formar parte de la investigación, comunicándoles que este estudio se realizaría teniendo en cuenta los principios éticos de la Declaración de Helsinki sobre la investigación clínica en humanos.

RESULTADOS

Métodos inmunoquímicos en los controles

De las dos formas de desenmascaramiento antigénico probadas, sólo el tratamiento con calor en baño térmico permitió el reconocimiento eficiente de los epitopes de la proteína mayoritaria de la cápside viral L1 de PVH 16, sin alteraciones en su conformación activa. La dilución óptima de trabajo del Ac primario empleado fue 1:100.

Se encontraron diferencias en cuanto a la sensibilidad analítica, tinción inespecífica de fondo y tiempo consumido en la realización de las técnicas ([tabla 1](#)). El procedimiento LSAB fue el más eficiente en la detección del antígeno L1 de PVH 16 para su aplicación en muestras clínicas. El mismo resultó altamente sensible, no mostró tinción inespecífica de fondo y los resultados fueron similares a los obtenidos por el sistema comercial de Amplificación por Polímero. Este último método mostró una baja tinción de fondo y el mayor ahorro de tiempo pues, debido al empleo de reactivos listos para su uso y la reducción de períodos de incubación, se obtuvieron resultados satisfactorios en solo 4 horas. El método Indirecto de Inmunoperoxidasa no resultó satisfactorio para este tipo de ensayo.

Las señales de inmunodetección del antígeno viral obtenidas en las líneas celulares, mostraron diferencias notables entre los controles positivos y el control negativo. El método LSAB funcionó de manera más eficiente en dichos controles ([figura 1](#)). La línea celular SiHa mostró inmunotinción nuclear y citoplasmática de color marrón que indicó la presencia del antígeno viral L1. En los tres métodos analizados los resultados observados en los controles clínicos de extendidos celulares y tejidos fueron similares a los que se obtuvieron en la línea celular.

Tabla 1. Parámetros técnicos analizados en la normalización de los tres métodos inmunoquímicos en los controles

Métodos Inmunoquímicos	Intensidad de la señal de inmunotinción	Fondo	Tiempo de terminación	
			Incubación Ac primario 16 horas	Incubación Ac primario 30 minutos
Inmunoperoxidasa	+	++	19,30 h	3,30 h
LSAB	+++	0	20,00 h	4,00 h
Polímero	+++	+	18,30 h	2,30 h

Fuente: Resultados del experimento.

0 (nula o negativa); + (débil o dudosa); ++ (moderada); +++ (intensa)

LSAB, labelled streptavidin-biotin

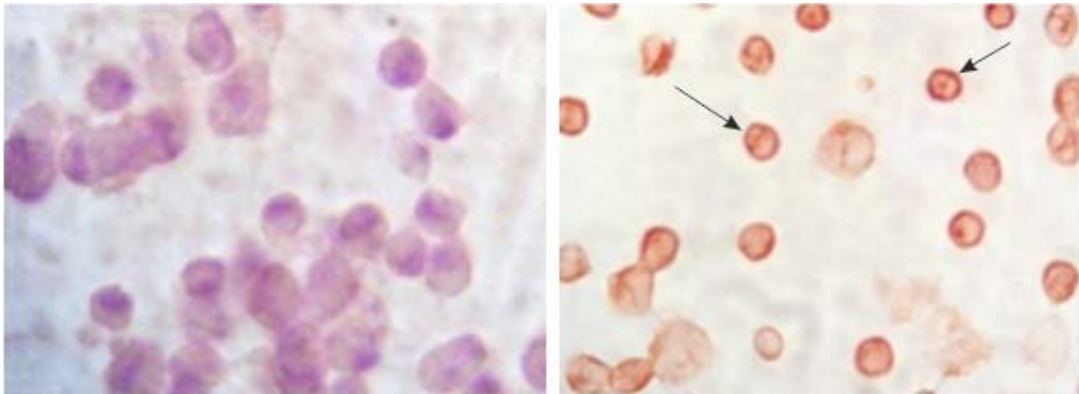


Fig.1. Inmunotinción de la proteína L1 de *Papilomavirus* Humanos tipo 16 (PVH 16) en diferentes líneas celulares de origen humano 20X: A) Fibroblastos como control negativo a PVH en los que solo se observa la coloración violácea de contraste con Hematoxilina; B) Flechas: Inmunotinción positiva de la proteína L1 de PVH 16 en células SiHa en las que se aprecia tinción nuclear y citoplasmática color marrón.

Aplicación del sistema LSAB en las muestras clínicas

El método inmunoquímico empleado para la detección del antígeno L1 de PVH 16 en muestras clínicas fue el sistema LSAB. Se empleó el desenmascaramiento antigénico por calor en baño térmico a 95 °C durante 30 min y una dilución de trabajo, del AcM primario, de 1:100 a 4 °C durante 30 minutos.

La positividad en la expresión de la proteína viral en los 82 casos de pacientes con citologías y biopsias de lesiones intraepiteliales cervicales, se detectó en extendidos celulares y cortes de tejidos. La observación de pigmentos de color marrón localizados en el núcleo, en el citoplasma y en la membrana plasmática indicó la presencia de este antígeno viral. El análisis inmunoquímico de las diez muestras previamente definidas como negativas por citología y RCP-TR, no mostró reconocimiento de los antígenos virales en ninguno de los casos.

En el 85,3 % de los extendidos celulares de las pacientes con lesión intraepitelial cervical, se identificó la presencia de la proteína L1 de PVH 16. Este antígeno se localizó en el núcleo y en el citoplasma de las células cervicales parabasales y superficiales (figura 2). En los tejidos de estas pacientes, dicho antígeno se localizó en el citoplasma de las células cervicales intermedias, parabasales y superficiales, y en el núcleo de las células superficiales del epitelio plano estratificado del cuello uterino (figura 3).

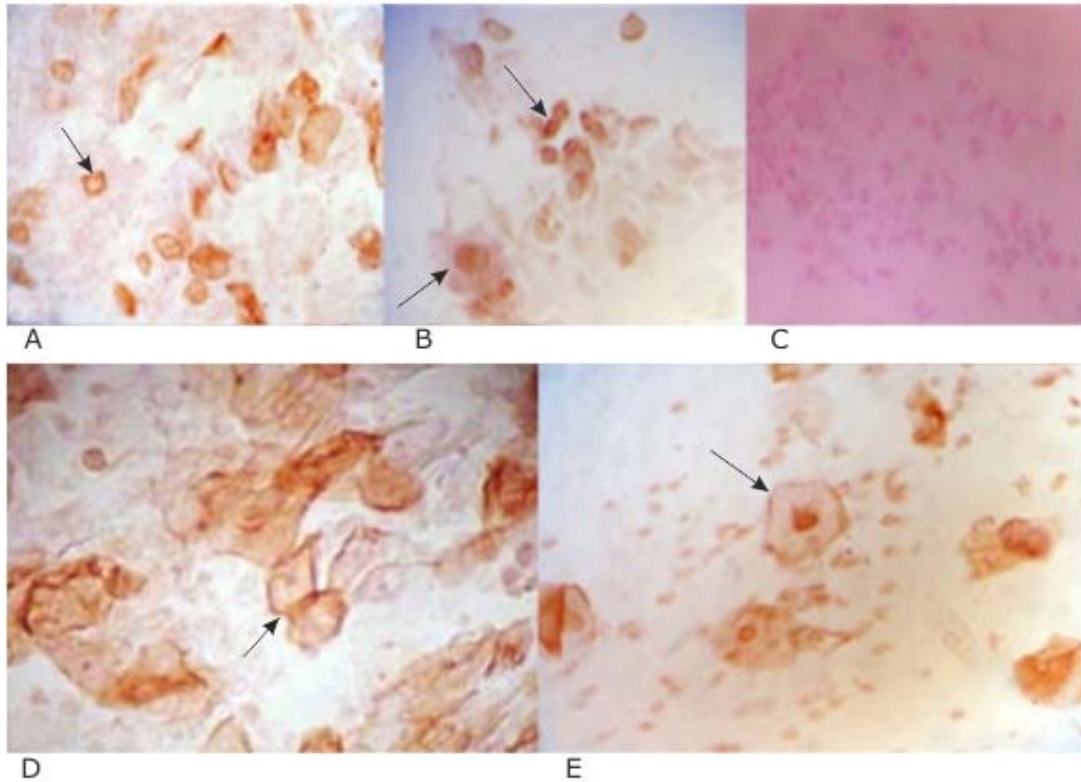


Figura 2. Inmunotinción positiva (color marrón) de la proteína L1 de PVH 16 en extendidos de células cervicales de muestras clínicas. A) Flecha: Núcleo de célula superficial 20X; B) Flecha superior: Núcleo y citoplasma de células parabasales; Flecha inferior: Núcleo de célula superficial 20X; C) Reacción negativa (coloración violácea de contraste con Hematoxilina) 10X; D) Flecha: Citoplasma y membrana plasmática de células superficiales 20X; E) Flecha: Núcleo y citoplasma de célula superficial 20X.

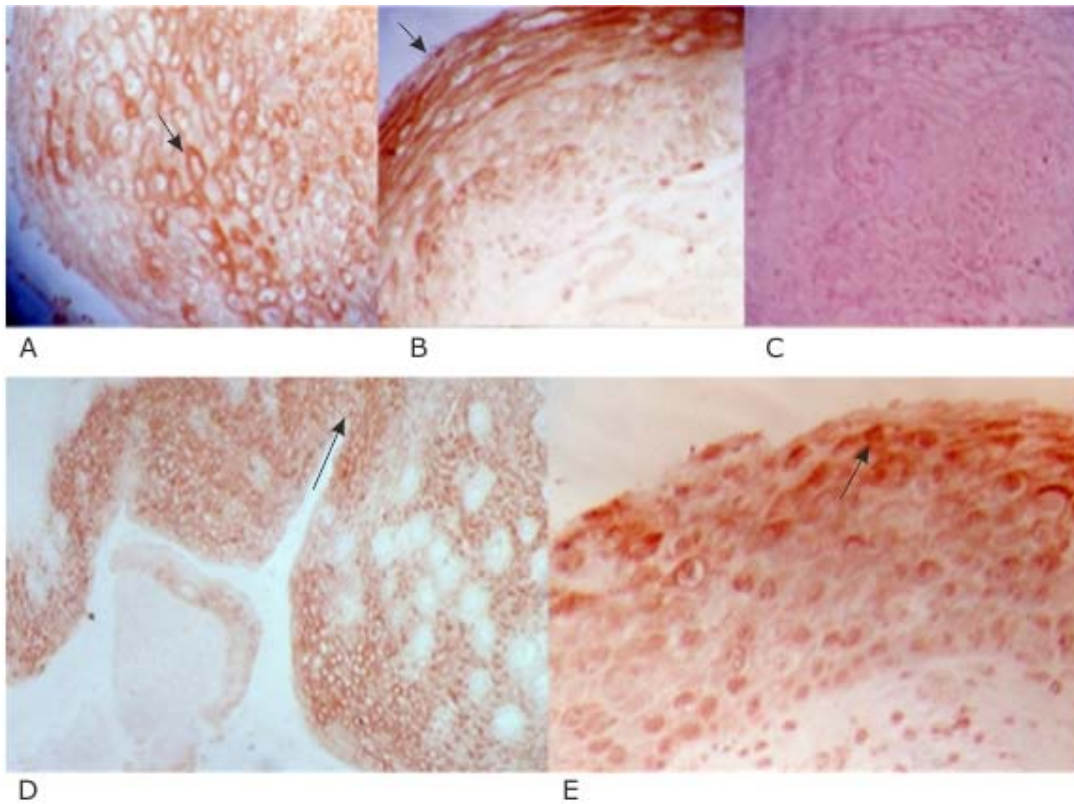


Fig. 3. Inmunotinción positiva (color marrón) de la proteína L1 de PVH 16 en secciones de tejido cervical. A) Flecha: Corte histológico de exocérnix con inmunotinción de citoplasma y membrana plasmática de células intermedias y parabasales del epitelio plano estratificado, 20X; B) Flecha: Inmunotinción de citoplasma de células superficiales y parabasales del epitelio plano estratificado, 20X; C) Reacción negativa (coloración violácea de contraste con Hematoxilina) 10X; D) Flecha: Inmunotinción positiva del epitelio plano estratificado en todo su grosor 10X; E) Flecha: Inmunotinción nuclear y de membrana plasmática de células superficiales y parabasales del epitelio plano estratificado 20X.

Al analizar la positividad a PVH en los cortes de tejido, los resultados coincidieron con los hallazgos obtenidos en los extendidos celulares. No hubo diferencias en el reconocimiento antigénico entre la inmunocitoquímica y la inmunohistoquímica. Con el empleo del método inmunoquímico se obtuvo una mayor detección para este tipo viral (85,3 %) que por RCP-TR (84,1 %), con una elevada coincidencia diagnóstica (98,6 %) entre estas pruebas pues no se encontraron diferencias significativas entre dichos valores. Los resultados del análisis estadístico muestran buenos valores de sensibilidad y especificidad para la técnica inmunoquímica al ser comparada con la técnica de referencia ([tabla 2](#)).

Tabla 2. Coincidencia y concordancia diagnóstica en la detección de PVH 16 por la técnica inmunoquímica y RCP en Tiempo Real en muestras con lesiones intraepiteliales cervicales

Inmunoquímica	RCP Tiempo Real		
	Positivas	Negativas	
Positivas	69	1	
Negativas	1	11	
Total (82)	70	12	
Parámetros de coincidencia diagnóstica entre las técnicas	Valor	Intervalo de confianza 95 %	
Sensibilidad	98,57 %	95,08	100,00
Especificidad	91,67 %	71,86	100,00
Índice de validez	97,56 %	93,61	100,00
Valor predictivo positivo	98,57 %	95,08	100,00
Valor predictivo negativo	91,67 %	71,86	100,00
Prevalencia	85,37 %	77,11	93,63
Índice de Youden	0,90	0,74	1,06
Razón de verosimilitud positiva	11,83	1,81	77,27
Razón de verosimilitud negativa	0,02	0,00	0,11
Kappa de Cohen	0,90	0,77	1,00

Fuente: Resultados del experimento. HSIL, del Inglés High-grade squamous intraepithelial lesions; LSIL, del Inglés Low-grade squamous intraepithelial lesions.

DISCUSIÓN

En la búsqueda de sistemas alternativos que complementen el diagnóstico de laboratorio de la infección por PVH se han explorado métodos inmunoquímicos para la detección de antígenos virales.¹⁵ En este sentido, la normalización de la técnica inmunoquímica en muestras clínicas constituye un paso fundamental.

El método de desenmascaramiento antigénico a utilizar depende de pasos previos que pueden ser críticos en la estructura y en la antigenicidad de las proteínas virales. El tipo de fijador empleado, su concentración, el pH y el tiempo de exposición, son factores que causan la pérdida de la inmunoreactividad para muchos antígenos, debido a los cambios que éstos introducen en la conformación e integridad de las proteínas componentes del tejido. En la optimización de los pasos de la técnica inmunoquímica, el desenmascaramiento enzimático con tripsina^{16,17} no resultó válido para la recuperación del antígeno viral en los controles utilizados en esta investigación. La digestión proteolítica de las muestras pudo conllevar a la destrucción de epitopes involucrados en la reacción.⁶ Por este motivo, en el presente trabajo, se empleó la exposición al calor (temperatura cercana al punto de ebullición del agua) para la restauración de la inmunoreactividad tanto en los

extendidos celulares como en los cortes de tejido FFEP. Aunque no se conocen exactamente los mecanismos de acción de los procesos de desenmascaramiento antigénico, el uso del calor ha resultado de gran importancia en revertir los daños causados por la fijación en formol y la inclusión en parafina.⁶

Al emplear el método convencional de inmunoperoxidasa en las técnicas inmunoquímicas, algunos autores han encontrado una baja sensibilidad para en la detección de antígenos virales, tanto para las muestras clínicas como para los controles de líneas celulares.¹⁸ Al comparar los tres procedimientos de inmunotinción analizados en este estudio, se encontró que la amplificación en la sensibilidad, inherente a la tecnología LSAB (basada en la alta afinidad de la estreptavidina por la biotina) y la de Polímero (un promedio de 70 moléculas de enzima y 10 moléculas de Ac secundario adjuntas a la columna de polímero) hacen a estos métodos más convenientes que el procedimiento convencional para la detección de proteínas virales en muestras clínicas.

En este estudio se corroboró la presencia de PVH 16 en lesiones intraepiteliales cervicales mediante el método inmunoquímico. La detección de proteínas virales expresadas en diversas muestras clínicas con lesiones premalignas y malignas asociadas a la infección por PVH, se emplea como un indicador de infección viral productiva y a su vez como una herramienta confirmatoria del diagnóstico citohistopatológico.¹⁹ La identificación específica de antígenos de PVH 16 en el epitelio cervical permite el estudio descriptivo más objetivo de los cambios morfológicos encontrados en el epitelio infectado. Existen numerosos estudios que refieren la baja sensibilidad de las técnicas inmunoquímicas cuando se utilizan para el diagnóstico de la infección viral, comparadas con las técnicas que detectan ADN de PVH.^{20,21} Sin embargo, el sistema LSAB tiene un potencial uso práctico para el diagnóstico de PVH por ser un método simple, rápido, barato y eficiente que en nuestro estudio, mostró una sensibilidad adecuada para la detección viral en lesiones cervicales. Por estas razones se puede considerar como un método apropiado para la confirmación del diagnóstico histopatológico.

Los valores de positividad a PVH 16 obtenidos en el presente trabajo mediante el método inmunoquímico fueron de 85,3 %. Otros estudios que emplean las técnicas inmunoquímicas para la detección de proteínas de PVH, reportan valores fluctuantes de positividad para el antígeno viral L1,^{22,23} algunos autores describen esta proteína en menos del 50 % de los casos¹⁵ y otros²⁴ plantean entre un 55 y un 65 % de positividad para este antígeno. Son pocos los estudios que muestran una positividad del 60 al 80 %, o más en la detección de PVH por inmunoquímica.^{25,26} En ninguno de los trabajos publicados se esclarece el porqué de esta divergencia en los valores de positividad, sin embargo pudiera deberse a la variabilidad inter-observador y a lo subjetiva que resulta la interpretación de estas técnicas. No obstante, las técnicas inmunoquímicas actualmente se emplean para evaluar la expresión de proteínas de PVH de alto riesgo, como biomarcador en la caracterización y progresión de lesiones cervicales.¹⁵

El método LSAB, normalizado mostró una coincidencia en el 98,6 % de los casos para la detección de PVH 16, al ser comparado con el protocolo de referencia. Con el empleo del método inmunoquímico se obtuvo una mayor detección para este tipo viral (85,3 %) que por RCP-TR (84,1 %), sin embargo no existen diferencias significativas entre ambas proporciones. Los valores de sensibilidad, especificidad, validez, valor predictivo negativo y positivo son buenos para la técnica inmunoquímica.

La detección de PVH proporciona una prueba de alta sensibilidad y una medida objetiva de la presencia del virus causante del cáncer cervical o lesión precursora de riesgo.²⁷ El valor principal de la prueba de detección de PVH en un programa de pesquisa es prevenir lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado en mujeres cuyas alteraciones podrían haber pasado inadvertidas con la búsqueda citológica solamente. El uso de la prueba inmunocitoquímica para la detección de PVH en conjunto con la citología puede reducir sustancialmente el número de mujeres cuyas lesiones permanecen no detectadas a pesar de que se sometan al análisis citológico regularmente. De acuerdo a los resultados de este estudio, se puede contar en el laboratorio con una metodología sensible, sencilla, rápida, relativamente barata y sin la necesidad de una compleja infraestructura para detectar PVH de alto riesgo oncogénico en muestras clínicas de cuello uterino. Sin embargo, son necesarios otros estudios donde se analice un mayor número de muestras para validar el método inmunoquímico en el diagnóstico de la infección por PVH 16 en mujeres cubanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5. Epub 2009/01/13.
2. De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124(7):1626-36. Epub 2008/12/31.
3. Coste J, Cochand-Priollet B, de Cremoux P, Le Gales C, Cartier I, Molinie V, et al. Cross sectional study of conventional cervical smear, monolayer cytology, and human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening. *BMJ*. 2003;326(7392):733. Epub 2003/04/05.
4. Murillo R, Almonte M, Pereira A, Ferrer E, Gamboa OA, Jeronimo J, et al. Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 11:L37-48. Epub 2008/11/26.
5. Bess S, Gran MA, Torres RM, Alonso I, Lopez LM, Velazquez JA, et al. Anuario Estadístico de Salud 2012. Especial ed. La Habana: Oficina Nacional de Estadísticas e Información de la Dirección Nacional de Registros Médicos del Ministerio de Salud Pública de Cuba; 2013. p. 1-205.
6. Boenisch T. Staining Methods. In: Boenisch T, editor. *Immunochemical Staining Methods H A N D B O O K* 3rd ed. California, USA: DakoCytomation - Carpinteria, CA, USA; 2001. p. 26-31.
7. Soto Y, Kourí V, Martínez PA, Correa C, Torres G, Goicolea A, et al. Standardization of a real-time based polimerase chain reaction system for the quantification of human papillomavirus of high oncogenic risk. *Vaccimonitor*. 2012;21(1):30-7.
8. Soto Y, Mune M, Morales E, Goicolea A, Mora J, Sanchez L, et al. Human Papillomavirus infections in Cuban women with cervical intraepithelial neoplasia. *Sex Transm Dis*. 2007;34(12):974-6.

9. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*. 2002;287(16):2114-9. Epub 2001. Forum Group Members and the Bethesda 2001 Workshop.
10. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*. 2009;44(4):302-7. Epub 2009/02/19.
11. Kiernan JA. Immunohistochemistry. In: Kiernan JA, editor. *Histological and histochemical methods Theory and practice*. Oxford, UK Scion Publishing Limited; 2010. p. 483-519.
12. Hernandez J, Elahi A, Siegel E, Coppola D, Riggs B, Shibata D. HPV L1 Capsid Protein Detection and Progression of Anal Squamous Neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2011;135:436-41.
13. Torres G IF, Capó V, López LX, López MC, Limonta D, Fenoy S, et al. Genital microsporidiosis in women with AIDS: A post-mortem study. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(1):47-50.
14. Jara D, Rengifo E, Seminario V, Malaspina MF, Yamada A, Vitorio J. Immunohistochemical detection of Human Papillomavirus in cervical cancer. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2000;61(1):31-6.
15. Kosel S, Burggraf S, Engelhardt W, Olgemoller B. Correlation of HPV16 L1 capsid protein expression in cervical dysplasia with HPV16 DNA concentration, HPV16 E6*I mRNA and histologic outcome. *Acta Cytol*. 2009;53(4):396-401. Epub 2009/08/25.
16. McLean CS, Churcher MJ, Meinke J, Smith GL, Higgins G, Stanley M, et al. Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol*. 1990;43(6):488-92. Epub 1990/06/01.
17. Banks L, Spence P, Androphy E, Hubbert N, Matlashewski G, Murray A, et al. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J Gen Virol*. 1987;68(5):1351-9. Epub 1987/05/01.
18. Holmes BJ, Westra WH. The expanding role of cytopathology in the diagnosis of HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck. *Diagn Cytopathol*. 2014;42(1):85-93. Epub 2013/06/12.
19. Lawson JS, Glenn WK, Heng B, Ye Y, Tran B, Lutze-Mann L, et al. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(8):1351-6. Epub 2009/09/24.
20. Griesser H, Sander H, Hilfrich R, Moser B, Schenck U. Correlation of immunochemical detection of HPV L1 capsid protein in pap smears with regression of high-risk HPV positive mild/moderate dysplasia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26(5):241-5. Epub 2004/11/25.

21. Hoshikawa S, Sano T, Yoshida T, Ito H, Oyama T, Fukuda T. Immunohistological analysis of HPV L1 capsid protein and p16 protein in low-grade dysplastic lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*. 2010;206(12):816-20. Epub 2010/10/23.
22. van Bogaert LJ. Cervical preneoplasia biomarkers: a conundrum for the community based gynecologic surgical pathologist. *J Gynecol Oncol*. 2014;25(1):3-5. Epub 2014/01/25.
23. Norman I, Hjerpe A, Andersson S. High-risk HPV L1 capsid protein as a marker of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV-positive women with minor cytological abnormalities. *Oncol Rep*. 2013;30(2):695-700. Epub 2013/06/13.
24. Rashed MM, Bekele A. The prevalence and pattern of HPV-16 immunostaining in uterine cervical carcinomas in Ethiopian women: a pilot study. *Pan Afr Med J*. 2011;8:21. Epub 2011/11/29.
25. Xiao W, Bian ML, Ma L, Liu J, Chen Y. [Detection of human papillomavirus L1 capsid protein expression in liquid-based cytology samples with abnormal cytology.]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009;44(12):887-91. Epub 2010/03/03.
26. Sarmadi S, Izadi-mood N, Pournashkari M, Yarandi F, Sanii S. HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;285(3):779-84. Epub 2011/07/27.
27. Choi YS, Kang WD, Kim SM, Choi YD, Nam JH, Park CS, et al. Human papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus type 16 as prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia 1. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(2):288-93. Epub 2010/02/06.

Recibido: 28 de mayo de 2014.

Aprobado: 4 de agosto de 2014.

MSc. Yudira Soto Brito. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Departamento de Virología. Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual. Carretera Novia del Mediodía Km 6 ½ PO Box 601. Marianao 13. Tel: (537) 2553551, Fax: (537) 202-0633, (537) 204-6051.

Correo electrónico: yudira@ipk.sld.cu; yudira@infomed.sld.cu