

DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE PAPILOMAVIRUS EN CANARIAS

Marga Edo*, Diana Corella*, Esther Foncubierta*, Ester Corbacho*, Mamen Sánchez-Hombroto*,

53, 66, 72 y 84 así como una baja frecuencia de los tipos 18 y 45, asociados a lesiones endocervicales. Asimismo se han detectado variantes atípicas de los VPHs 66 y 61, y algunos genotipos que no han podido ser identificados.

HPV66	13	6,70%	HPV81	3	1,55%
HPV31	10	5,15%	HPV62	2	1,03%
HPV72	10	5,15%	HPV66 atp	2	1,03%
HPV84	10	5,15%	HPV71	2	1,03%
HPV33	9	4,64%	HPV83	2	1,03%
HPV11	7	3,61%	HPV89	2	1,03%
HPV52	7	3,61%	HPV30	1	0,52%
HPV58	6	3,09%	HPV39	1	0,52%
HPV18	5	2,58%	HPV57	1	0,52%
HPV59	4	2,06%	HPV61atp	1	0,52%
HPV61	4	2,06%	HPV68	1	0,52%
HPV70	4	2,06%	HPVIND	8	4,12%

Método

Protocolo de detección y tipado de papilomavirus (kit *Papitype*[®]):

1) **Extracción del ADN vírico:** se ha realizado mediante una lisis de las proteínas.

Marga Edo*, Diana Corella*, Esther Foncubierta*, Ester Corbacho*, Mamen Sánchez-Hombroto* y Diego Arroyo*

CircaGen S.L., Colombia 47, 28016 Madrid.

Progenie Molecular S.L. Benjamín Franklin 12. Parque Tecnológico, 46980 Paterna, Valencia.

Resultados

Se han analizado 626 muestras cervicales procedentes de mujeres canarias con un resultado previo positivo de lesión escamosa epitelial de alto o bajo grado (HSIL o LSIL) o dudoso (ASCUS) en una citología exfoliativa genital. Los resultados de la detección y tipado de papilomavirus se resumen en las siguientes tablas.

MUESTRAS	Número	%
TOTAL	626	100,00%
HPV+	194	30,99%
HPV-	432	69,01%

MUESTRAS	Número	%
1 HPV	175	90,21%
2 HPV	17	8,76%
3 HPV	2	1,03%

TIPO	Número	%
HPV16	50	25,77%
HPV53	26	13,40%
HPV6	15	7,73%

TIPO	Número	%
HPV82	4	2,06%
HPV54	3	1,55%
HPV56	2	1,03%

Introducción

Los Papilomavirus Humanos (VPHs) son virus de ADN doble cadena que causan lesiones en el epitelio. Se han descrito más de 100 tipos distintos de los cuales pueden provocar neoplasias epiteliales en el cérvix y otras lesiones. Los estudios epidemiológicos indican que los genotipos mucosotrópicos (16, 18, 45, 31, 6, 58 y 35 (A))

Se han analizado más de 600 muestras cervicales procedentes de mujeres canarias. La detección de papilomavirus se ha realizado mediante el kit *Papitype*[®] (Progenie molecular, S.L.). Este método permite distinguir entre 58 genotipos de papilomavirus, incluyendo algunos recientemente descritos, por lo que es adecuado para la realización de estudios poblacionales.

Los resultados de este estudio indican una distribución particular de VPHs en la población canaria. Comparativamente se ha observado una alta frecuencia de los tipos

Los resultados de este estudio indican una distribución particular de VPHs en la población canaria. Comparativamente se ha observado una alta frecuencia de los tipos

víricos y celulares utilizando proteínasa K en un tampón adecuado. Las muestras que han inhibido la reacción de amplificación se han re-procesado utilizando el sistema *Qiamp blood mini kit* (Qiagen).

2) **Amplificación mediante PCR (polymerase chain reaction):** el protocolo está basado en la amplificación de un fragmento de 450 pb de la región L1, común a todos los VPHs, utilizando los conocidos oligonucleótidos MY11/MY09 (B). La mezcla de amplificación permite obtener simultáneamente un producto de 592 pb de un control interno, con objeto de detectar los falsos negativos.

3) **Análisis de fragmentos de restricción del producto de amplificación:** el genotipado se realiza mediante análisis de fragmentos de restricción, utilizando 2 mezclas distintas de endonucleasas. El producto de amplificación se divide en 2 alícuotas que son digeridas por separado, y analizadas en un gel de agarosa al 3%. Opcionalmente puede analizarse un alícuota de 10 µL del producto de PCR sin digerir, para descartar los negativos.

4) **Determinación del genotipo de papilomavirus:** el genotipo vírico se determina mediante comparación de los 2 análisis de restricción realizados con la muestra, respecto a los patrones de restricción teóricos. Este análisis permite determinar de forma prácticamente inequívoca el tipo vírico. Los resultados dudosos y las variantes atípicas se han analizado mediante secuenciación de la región amplificada o bien mediante un estudio de restricción alternativo.

Se analizaron los aislados atípicos de los VPHs 66 y 61 mediante secuenciación de la región amplificada de 450 pb (utilizada como referencia para la clasificación de los papilomavirus). Se comprobó que se trata de aislados no descritos previamente. Los 2 aislados del VPH 66 presentaban 2 mutaciones puntuales idénticas. El aislado del VPH 61 presenta una similitud de secuencia del 97 % respecto al tipo de referencia.

Conclusiones

Los resultados sugieren que la población canaria presenta una distribución particular de papilomavirus. Comparativamente se ha observado una alta frecuencia de los tipos 53, 66 y 84. Cabe destacar la detección de algunos tipos víricos como los VPHs 84 (10), 72 (10), 70 (4), 82 (4), 81 (3), 83 (2) y 89 (2), habitualmente no detectados en otros estudios poblacionales. Por otro lado, destaca la baja frecuencia del tipo 18, y en particular el hecho de que ninguna muestra era portadora del VPH 45.

Se ha detectado una nueva variante del VPH 66 en 2 muestras. Estas presentaban 2 mutaciones puntuales idénticas en la región analizada, lo que sugiere que puede tratarse de una variante característica de las Islas Canarias.

Se ha detectado un nuevo subtipo del VPH 61 en 1 muestra. Este aislado presenta una similitud de secuencia del 97 % respecto a la secuencia de referencia. Según los criterios actuales para la clasificación de papilomavirus este aislado debe ser considerado un nuevo subtipo del VPH 61.

La detección de VPHs no identificados en 8 muestras se debe a la baja carga viral presente en las mismas, por lo que no debe ser interpretado como la existencia de otras variantes atípicas.

La particular distribución de genotipos de papilomavirus en la población canaria sugiere que las vacunas recientemente comercializadas confieren una protección relativamente menor frente al cáncer de cuello de útero. Estas vacunas están basadas en los genotipos teóricamente más frecuentes 16, 18, 6 y 11.

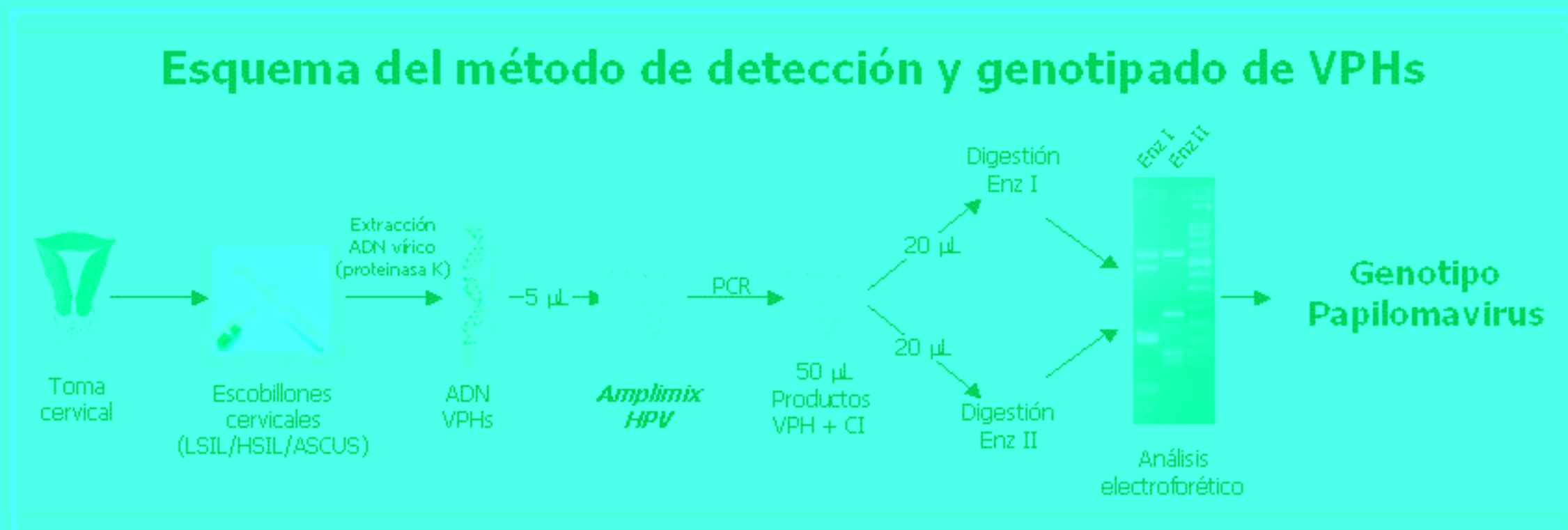


Figura 1. Método de detección y tipado de papilomavirus según el kit *Papitype*.



Figura 2. Kit *Papitype*[®].

Patrones de restricción VPH	
Enz I	16
Enz I	18
Enz I	6
Enz I	11
Enz I	53
Enz I	31
Enz I	35
Enz I	58
Enz I	82
Enz I	54
Enz I	56
Enz II	16
Enz II	18
Enz II	6
Enz II	11
Enz II	53
Enz II	31
Enz II	35
Enz II	58
Enz II	82
Enz II	54
Enz II	56

Figura 3. Patrones de restricción para la determinación del tipo de papilomavirus.

Referencias

- (A) Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348:518.
- (B) Manos M, Ting Y, Wright K, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital papillomaviruses. *Cancer cells*. 1989; 209-214.