

Prevalencia del papillomavirus humano en lesiones benignas, premalignas y malignas del cérvix uterino

M. TORROELLA¹, M. ZELADA¹, D. DÍAZ¹, M. RAMÍREZ¹, MA. DEL C. PONCE², H. SARIOL² y J.J. LENCE¹

¹ Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

² Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro", 21 y 4, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en junio de 1990

Aprobado en abril de 1991

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la prevalencia de los papillomavirus humanos tipos 6, 11, 16 y 18 encontrada en una muestra de mujeres con patologías premalignas y malignas del cérvix uterino, así como en algunas muestras de lesiones benignas del mismo tejido. Para el diagnóstico viral se empleó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos "dot blot" con marcaje radioactivo. Se discuten las características del método diagnóstico empleado, así como las ventajas y desventajas de los dos tipos de toma de la muestra del cérvix utilizados: el raspado y la biopsia.

Se comenta el valor de la prevalencia global encontrada, 86.3%, así como el patrón de distribución de los cuatro tipos virales, y se compara el diagnóstico de un grupo de muestras empleando simultáneamente en ellas el *dot blot* y el *Southern blot*, el cual permite además conocer el estado físico en que se encuentra el virus en el genoma humano infectado.

Se analiza la relación entre diferentes variables (edad, edad de las primeras relaciones sexuales, número de parejas sexuales diferentes, tipo de contraceptivos usados, edad del primer parto, número de partos, histología de la lesión) con la infección viral en la muestra de mujeres estudiadas.

SUMMARY

In the present work we report the prevalence of the HPV types 6, 11, 16 and 18 found in a sample of women with premalignant and malignant pathologies

of the cervix uteri as well as in several samples of benign lesions of the same tissue. For the viral diagnosis, the *dot blot* nucleic acids hybridization technique with radioactive labelling was employed.

The characteristics of the diagnostic method used are discussed, as well as the advantages and disadvantages of the two different types of sampling from the cervix tissue employed: scrapes and biopsies. The prevalence value obtained, 86.3%, and the distribution pattern for the different viral types are discussed, and a diagnostic comparison is made with a group of samples employing simultaneously *dot* and *Southern blots*. The latter enables in addition to know the physical state of the virus in the human infected genome.

The relation among different variables (age, age of the first intercourse, number of sexual partners, contraceptive methods employed, number of pregnancies, age of the first pregnancy) with the viral infection is analyzed in the sample of women studied.

INTRODUCCION

Tanto el cáncer como las lesiones premalignas del cérvix uterino tienen un comportamiento epidemiológico similar al de las enfermedades sexualmente transmisibles (Muñoz *et al.*, 1988). Son factores de riesgo para padecer estas neoplasias el inicio temprano de las

relaciones sexuales en una mujer así como el número de parejas sexuales que ha tenido en el transcurso de su vida. Incluso, la promiscuidad de los compañeros sexuales que tiene o ha tenido, forma parte de este riesgo (Muñoz *et al.*, 1988). Entre los agentes infecciosos sexualmente transmisibles que han sido invocados en el origen y desarrollo de estas patologías están los papillomavirus humanos, PVHs, (Pfister, 1987).

Las evidencias experimentales y epidemiológicas favorecen la hipótesis de que son los PVHs los principales agentes biológicos transmisibles relacionados con el origen o desarrollo de estas neoplasias (Zur Hausen y Schneider, 1987). Actualmente se trabaja intensamente en el esclarecimiento de la posible relación causal entre el cáncer anogenital en general y la infección por PVHs, aunque en rigor aún no puede hablarse de relación etiológica, ante la falta de evidencias experimentales o epidemiológicas concluyentes (Muñoz *et al.*, 1988).

Hoy en día se conocen casi 70 tipos diferentes de PVHs, que son pequeños virus ADN que infectan epitelios y mucosas. De éstos, unos cuantos tipos son los que infectan localizaciones anogenitales. Entre ellos están los PVHs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52. Los tipos 6 y 11 son reconocidos como la causa de las verrugas genitales benignas conocidas como condilomas (planos o acuminados). Esta afección es considerada actualmente como la enfermedad venérea más difundida en todo el mundo (Meisels, 1990).

Con el advenimiento de las técnicas de ADN recombinante, han podido detectarse genomas de los distintos tipos de PVHs anogenitales en neoplasias malignas y premalignas del cérvix, vulva, vagina y pene

(Lorincz *et al.*, 1989, Sugase *et al.*, 1989). Los virus 16 y 18, a diferencia de los tipos 6 y 11, generalmente se encuentran en cáncer o en lesiones premalignas más avanzadas de cuello de útero (displasias moderadas o severas, actualmente conocidas como neoplasias intraepiteliales cervicales, NICs II y III respectivamente), de modo que hay autores que reconocen a los tipos virales en sí como factores pronóstico de las lesiones (Lorincz *et al.*, 1987).

El cuadro no es tan simple, y se describen como muy frecuentes lesiones mosaico en las que coexisten condilomas con NICs severas, incluso con cáncer, y toda la gama de los diferentes tipos virales infectando las distintas lesiones (Meisels, 1990). Ante la creciente importancia que va cobrando la detección de PVHs, nos propusimos estudiar la prevalencia de este virus en un grupo de mujeres con patologías de cérvix en nuestro medio, usando métodos diagnósticos basados en la hibridación de ácidos nucleicos. En el presente trabajo se reporta la prevalencia viral encontrada y se discuten algunas de las características del método diagnóstico empleado.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes incluidas

Se estudiaron 100 casos consecutivos de mujeres entre 19 y 69 años de edad, asistentes entre los meses de enero a octubre de 1989 a las consultas de patología de cuello del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (86 casos) y del Hospital Ginecobstétrico "Ramón González Coro" (14 casos), ambos de Ciudad de La Habana. Las consultas de patología de cuello atienden referidamente a mujeres con citologías compatibles con NICs de diferentes grados o con alteraciones citológicas sugestivas de cáncer.

Toma de la muestra

A todas las mujeres les fue efectuado un examen ginecológico consistente en colposcopia, citología e histología del cérvix. Cuando las condiciones de las pacientes lo permitieron, les fueron tomadas el mismo día dos tipos de muestras para el diagnóstico de PVH: un raspado del cérvix (con la espátula de Ayre convencional) y un ponche de biopsia colposcópica dirigido. Todas las pacientes se sometieron al menos a uno de los dos tipos de muestreo (Kjaersk y Lyng, 1989). Adicionalmente cada paciente fue entrevistada con el fin de conocer datos personales relacionados principalmente con su vida sexual y reproductiva. Las espátulas con el raspado se introdujeron inmediatamente en un tubo con tampón de lisis (NaCl 76 mM, EDTA 24 mM) y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento para la obtención de ADN. Los ponches de biopsia fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente congelados a -20°C hasta su procesamiento para la obtención de ADN.

Obtención de ADN de células de cérvix

A partir de raspado

Los tubos con las espátulas que contienen el raspado se agitan violentamente durante 1 minuto en vórtex para desprender las células de la madera. Estas son colectadas por centrifugación (3000 rpm, 10 minutos) y resuspendidas en 1 ml de tampón de lisis, 1 mg de pronasa y SDS 1%, dejándose incubar a 37°C durante toda la noche (16 horas), (Hallam *et al.*, 1989).

A partir de la biopsia

La biopsia congelada se homogeneiza en 1 ml de tampón de lisis con un homogeneizador de cuchillas de alta velocidad (Polytron) a la mayor velocidad durante 2 segundos. El homogeneizado se incuba en presencia de 1mg de pronasa y SDS 1% a 37°C durante toda la noche (16 horas). A partir de este punto se prosigue la obtención, del ADN, de igual forma en ambos casos: se hacen dos extracciones de la fase acuosa con igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) de 30 minutos cada una en vórtex, y a continuación se precipita el ADN con 1/10 del volumen de NaAc 3M y tres volúmenes de etanol frío, dejándose a -20°C durante 16 horas. El ADN precipitado, colectado por centrifugación a 13000 rpm diez minutos, se disuelve en Tris 10 mM/EDTA 1 mM pH 8 y se cuantifica por espectrofotometría a 260 nm.

Método diagnóstico del PVH empleado

Para la detección de PVHs a partir del ADN de cérvix se usó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos conocida como *dot blot* (Lancaster y Norrild, 1989). Para ello, de todas aquellas pacientes en las que fue posible se aplicó 1 µg de ADN de células del raspado y 1 µg de ADN de células de la respectiva biopsia, en filtros de nitrocelulosa Hybond C, (Amersham, Inglaterra), con ayuda de un aparato Manifold (Biorad, Estados Unidos). Al menos uno de los dos tipos de muestra se aplicó en todos los casos. Antes de su aplicación, las muestras de ADN se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos en presencia de NaOH 0.4 M y se neutralizaron con igual volumen de NH₄Ac 2M pH 7. En cada pozo se aplicó un total de 100 µl de muestra. Cada par de muestras correspondiente a una paciente se aplicó en cuatro filtros independientes para su hibridación por separado con los virus 6, 11, 16 y 18 respectivamente. Cada filtro incluyó muestras de ADN controles: leucocitos humanos como control negativo y carcinoma invasor de cérvix positivo a algunos de los cuatro virus estudiados como control positivo. Adicionalmente otro control positivo incluido en los filtros fue el representado por 50 pg de la sonda ADN del tipo viral que fue diagnosticado en cada filtro, adicionados a 1 µg de ADN de leucocitos humanos.

Sondas de PVHs empleadas

Las secuencias genómicas completas de 8Kb de los PVHs 6, 11, 16 y 18 insertadas en PBR322 fueron obtenidas a través del Prof. H. zur Hausen, Alemania. Para la hibridación se usaron los insertos de 8Kb virales, extraídos de los plasmidios por digestiones con las enzimas de restricción BamH1 (ENZIBIOT, Cuba) para el caso de los virus 6, 11 y 16, y EcoR1 (ENZIBIOT, Cuba), para el virus 18. La separación de los insertos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Farmacia, Suecia). Las sondas de los cuatro virus fueron marcadas radioactivamente con alfa dATP- P32 (Amersham, Inglaterra) por el método de los "iniciadores al azar" (Feinberg y Vogelstein, 1983).

Hibridación *dot blot*

Los filtros se prehibridaron durante 16 horas a 42°C en sobres de nailon a razón de 50 µl de solución por centímetro cuadrado de filtro. La solución de prehibridación consistió en 50% formamida, 5xSSC (1x SSC es 150 mM NaCl/15 mM Na citrato), 5x Denhart (100x Denhart es 1% polivinil pirrolidona, 1% Ficoll, 1% albúmina de suero bovina), 0,1%SDS y 500 µg/ml ARNt de levadura. La hibridación se

realizó durante 20 horas a la misma temperatura usando la misma solución de prehibridación a la cual se le agregó la sonda radioactiva a la concentración de 5 millones de cpm/ml de solución. Los filtros se lavaron en condiciones de alta astringencia: 2xSSC/0,1 % SDS un cambio de 5 minutos a temperatura ambiente; 2xSSC/0,1 % SDS tres cambios de 15 minutos cada uno, a 42°C; 0,1xSSC/0,1% SDS tres cambios de 15 minutos cada uno a 42°C, y por último 0,1xSSC/0,1% SDS un cambio de 10 minutos a 60°C. Las autorradiografías se realizaron exponiendo los filtros a películas de rayos X Agfa Gevaert (Bélgica) a -70°C durante 24 horas, 3 días y 11 días, respectivamente.

Crterios de positividad para la infección por PVHs

Todas las autorradiografías con los diagnósticos de PVHs fueron examinadas a ciegas e independientemente por dos investigadores. Sólo en los casos en que hubo coincidencia entre los investigadores en el hallazgo de un caso positivo se aceptó éste como tal. Un valor se consideró positivo cuando dio una señal autorradiográfica más oscura que la más oscura de las señales de fondo de los controles negativos incluidos en el filtro analizado (en cada filtro se aplicaron al menos dos muestras de controles negativos). La infectividad fue estimada cualitativamente como positiva o negativa.

Hibridación *Southern blot*

Con el objetivo de conocer el estado físico (integrado o episomal) del virus en algunas muestras de NICs y en un carcinoma invasor del cérvix que resultaron positivas por *dot blot* al PVH 16, se efectuó un *Southern blot* (Southern, 1975). Para ello se digirieron 7 µg de ADN de las biopsias de esas muestras con la enzima Bgl II (ENZIOBIOT, Cuba), que no corta al PVH 16. La técnica del *Southern* se realizó por transferencia capilar a filtro de nitrocelulosa Hybond C. (Amersham, Inglaterra) según lo habitual (Fuchs *et al.*, 1988). Las condiciones de prehibridación e hibridación fueron las mismas empleadas en el *dot blot*.

Evaluación estadística

El test de χ^2 se empleó para analizar la relación entre la infección viral y diversas variables (edad, edad de las primeras relaciones sexuales, número de parejas sexuales diferentes, número de partos, edad del primer parto, tipos de contraceptivos, hábito de fumar).

RESULTADOS

De 100 mujeres examinadas, 73 resultaron útiles para nuestro estudio y 27 fueron excluidas por no haber podido obtenerse de ellas suficiente cantidad de ADN para el diagnóstico viral. De las 73 mujeres, 63 resultaron positivas, al menos a uno de los cuatro tipos virales estudiados, mostrando una prevalencia global de infectividad del 86,3%. Una mujer fue considerada infectada por PVH cuando resultó positiva, al menos, a uno de los cuatro tipos virales en por lo menos uno de los dos tipos de muestras realizadas (figura 1).

Las cantidades promedio de ADN obtenidas con los dos tipos de muestras examinadas no difirieron grandemente: 47,2 µg para las biopsias y 35,1 µg para los raspados cervicales. En 21 muestras se obtuvo más ADN en las biopsias que en los raspados (58,3%), en 14 muestras se obtuvo más ADN en los raspados que en las biopsias (38,8%) y en un caso se obtuvo la misma cantidad en ambas muestras (1,1%). De 73 mujeres, 36 tuvieron muestras duplicadas del cérvix (biopsia y raspado), para un 49%. El resto, tuvo sólo una de ellas.

De las pacientes con muestras duplicadas, en 13 casos (36%) coincidieron los diagnósticos virales en ambos tipos de muestras para los cuatro virus. En el resto hubo discrepancias en al menos un virus. Por tipos de virus, el PVH 6 resultó el de mayor prevalencia (76,2%), seguido del PVH 18 (73%), el PVH 16 (65,1%) y el PVH 11 (55,6%). De los 63 casos infectados, solo 9 (14,3%) fueron positivos a un virus. La gran mayoría de los casos (85,7%) presentaron infección mixta a diversos tipos: a dos virus el 22,2%, a 3 virus el 37% y a los 4 virus el 40,7% de los casos (tabla 1).

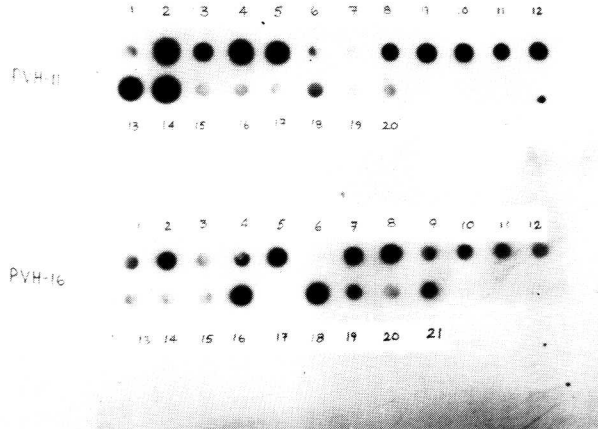


FIG. 1. Diagnóstico por dot blot de PVHs 11 y 16 en cérvix uterino. En ambos filtros las muestras son: 1 y 17: controles negativos (1 µg ADN leucocitario humano), 18: control positivo (50 pg ADN de PVH 11 ó 16, respectivamente en cada filtro), 16: control positivo (1 µg ADN carcinoma de cérvix, positivo al PVH-16). El resto muestras de ADN de raspados y biopsias del cérvix de diferentes casos.

Tabla 1
INFECCION POR PVHs 6, 11, 16 Y 18 EN EPITELIOS
DE CERVIX CON DIFERENTES HISTOLOGIAS (n=66 MUJERES)

	Epitelio no NIC	Condiloma	NIC I	NIC II	NIC III	Carcinoma microinvasor	Total de casos por tipo viral
Total de casos estudiados:	5 (4)	19 (17)	12 (11)	5 (5)	21 (18)	4 (4)	
PVH:*							
6	1	0	2	0	0	1	4
11	0	0	0	0	1	0	1
16	0	0	0	0	1	0	1
6 + 18	0	3	0	0	2	1	6
6 + 16	0	1	0	1	1	0	3
6 + 11	0	0	0	0	2	0	2
11 + 16	0	0	0	0	0	1	1
16 + 18	0	0	0	0	1	0	1
6 + 16 + 18	0	2	2	1	2	0	7
11 + 16 + 18	2	2	1	0	1	0	6
6 + 11 + 18	0	1	2	0	0	0	3
6 + 11 + 16	0	1	1	0	0	0	2
6 + 11 + 16 + 18	1	7	3	3	7	1	22

Nota:

Los valores entre paréntesis representan los casos positivos.

(*) Tipos virales diagnosticados en las lesiones histológicas

No se encontró ningún caso infectado exclusivamente por PVH 18

De las 73 mujeres estudiadas, pudimos obtener datos completos de 66 de ellas, lo cual permitió conocer el grado de asociación entre el diagnóstico histológico de la lesión y el tipo de virus: 5 casos tuvieron diagnóstico histológico no compatible con NIC ni condiloma (cervicitis, pólipos cervicales, cuellos normales), 19 fueron condilomas planos sin NIC, 12 casos de NIC I, 5 casos de NIC II, 21 casos de NIC III y 4 casos de carcinomas microinfiltrantes. La gran mayoría de las NICs y de los carcinomas presentaron asociadas lesiones histológicas del tipo de los condilomas planos. La evaluación de las asociaciones estadísticas entre diferentes variables personales y la infección por

PVH, con la aplicación del test de χ^2 demostró la no existencia de significación estadística en las mismas.

El análisis de los resultados del *Southern blot* (figura 2) para tres casos de NICs (2 NIC III y 1 NIC II) y para un caso de carcinoma microinvasor del cérvix, positivos los cuatro a PVH 16 por *dot blot*, confirmó el diagnóstico de infección por ese tipo viral para uno de los casos de NIC III y para el caso de NIC II, además de para el carcinoma microinvasor. En cambio, no lo confirmó para el caso restante de NIC III. Como se evidencia en el patrón de restricción obtenido con la enzima Bgl II, en todos los casos el PVH 16 se encuentra mayoritariamente en forma integrada al ADN celular.



FIG. 2. Diagnóstico de PVH-16 por *Southern blot*. Todas las muestras de ADN humano consistieron de 7 μ g de ADN digeridos con enzima de restricción Bgl II
Carrilera 1: banda de 8 kb de PVH-16
Carrilera 2: control negativo (ADN leucocitario)
Carrilera 3: carcinoma microinvasor
Carrilera 4: NIC II
Carrilera 5: NIC III
Carrilera 6: NIC III (positivo por *dot blot*, no confirmado por *Southern*).

DISCUSION

Nuestro trabajo reporta la prevalencia de infección por PVH encontrada en una muestra de 73 mujeres portadoras de diferentes patologías benignas, premalignas y malignas del cérvix uterino, asistentes a dos hospitales de ciudad de La Habana durante gran parte del año 1989. De estas mujeres, 66 presentaron una historia clínica completa. Este grupo consistió en 5 casos sin NIC (lesiones benignas del cérvix), 19 casos de condiloma plano, 12 casos de NIC I, 5 casos de NIC II, 21 casos de NIC III y 4 carcinomas microinfiltrantes del cérvix. El diagnóstico viral se efectuó por medio de la técnica de hibridación de ácidos nucleicos *dot blot*. Se acepta que la prevalencia de la infección por PVH encontrada en cualquier grupo depende de las características del mismo, así como del tipo de muestra biológica en la cual se efectúa el diagnóstico y de la sensibilidad del método empleado en la detección viral (Fuchs *et al.*, 1988).

Estudios previos han demostrado la presencia de genomas de PVHs en la mayoría de las lesiones NIC (41-83%), siendo el PVH 16 el tipo más prevalente (Crum *et al.*, 1984; Mc Cance *et al.*, 1985). En los carcinomas invasores del cérvix, la prevalencia reportada se incrementa hasta 90% para el PVH 16 (Fuchs *et al.*, 1989). Nuestros resultados en el grupo de mujeres estudiadas muestran una prevalencia global del 86,3%, lo cual demuestra una elevada difusión de este virus en nuestras condiciones.

Un hallazgo interesante que coincide con lo reportado por González y Claro (comunicación personal) es la distribución particular de los tipos virales en los grupos de mujeres cubanas con patologías de cérvix. Estos autores encontraron que el PVH 18 resultó ser el tipo más prevalente en su muestra. Nuestros resultados sugieren que el PVH 6 seguido del 18 (con 76,2 y 73% de prevalencia, respectivamente) son los dos tipos virales más frecuentemente encontrados en las mujeres examinadas. Es importante señalar que la mayor parte de los casos de NICs y carcinomas estudiados tenían lesiones condilomatosas asociadas, las cuales se relacionan casi exclusivamente con los tipos 6 y 11. Consecuentemente, no es sorprendente la elevada prevalencia del PVH 6 encontrada, lo que deja al PVH 18 como el tipo más frecuentemente asociado a NICs en nuestro medio. En Europa y Japón, la prevalencia del PVH 18 es más baja que en América (Boshart *et al.*, 1984). Algunos autores señalan que el tipo 18 se asocia casi exclusivamente con las NICs más severas y con los carcinomas, y ciertas evidencias lo asocian también con un mal pronóstico en cáncer de cérvix (Lorincz *et al.*, 1987). Por tanto, es preocupante el hallazgo de una elevada prevalencia del tipo 18 en nuestros casos, incluso en mujeres con

condilomas, y aún más, en mujeres con cuellos aparentemente normales o con lesiones benignas. Otro rasgo particular del patrón de infección por PVH encontrado en nuestra muestra lo constituye la multiplicidad de infección por diferentes tipos virales (85.7%), incluso, aun en mujeres sin patología cervical.

En relación con el tipo de muestra biológica usada en el diagnóstico viral, comparamos exudados cervicales con biopsias. Los exudados se realizan normalmente a mujeres para la prueba citológica o test de Papanicolau. La biopsia en cambio es una prueba agresiva, que sólo se justifica cuando la paciente padece alguna patología cervical, pero no para un diagnóstico viral solamente. Ambos tipos de muestras tienen sus ventajas y sus desventajas: los exudados son más representativos de las capas más superficiales del epitelio cervical, y si existen pocas células con una baja infectividad, el virus puede diluirse y permanecer no detectado. Lo mismo sucedería si las partículas virales infectan las capas más profundas del epitelio, a las cuales no tiene acceso el exudado cervical.

En contraste, la biopsia es una toma puntual de tejido, dirigido casi siempre por colposcopia. Por tanto es representativa sólo del área cervical que aparece colposcópicamente afectada, aunque ofrece una mayor cantidad de tejido para el análisis. Nuestros resultados demuestran que el muestreo por exudado puede ser tan útil como el muestreo por biopsia desde el punto de vista del rendimiento de ADN. Sin embargo, comprobamos que el diagnóstico depende del tipo de muestra: se obtuvo solamente el 36% de coincidencias en el diagnóstico cuando se compararon simultáneamente ambos tipos de muestras en cada mujer. Este valor de coincidencia en ambos diagnósticos coincide con el

reportado por Hallan *et al.*, (1989), quienes informaron el 34% del referido valor cuando se comparan exudados y biopsias en el diagnóstico del PVH.

El método de *dot blot* empleado tiene varias ventajas que lo hacen muy popular para los propósitos de pesquijaje: es rápido, simple y no tan caro como los restantes métodos de hibridación molecular. Sin embargo, una de sus desventajas es la unión inespecífica de la sonda al ADN aplicado en el filtro, lo cual incrementa el porcentaje de falsos positivos que tiene esta prueba (Lancaster y Norrild, 1989). Esta es la razón de por qué los controles positivos y negativos son aquí imprescindibles, como también lo son las condiciones de elevada astringencia en la hibridación.

Otra desventaja del *dot blot* en comparación con el *Southern*, por ejemplo, es que el *dot* es incapaz de brindar información sobre el estado físico en el que se encuentra el virus en la célula infectada, lo cual es posible usando el *Southern*. Adicionalmente, aunque el *dot* y el *Southern* parecen tener sensibilidades parecidas (Lancaster y Norrild, 1989), el *dot* es menos específico que el *Southern*. Esto último se observa en nuestros resultados, en los cuales una de las muestras presuntamente positivas al PVH 16 por *dot blot* resultó negativa al mismo virus cuando el diagnóstico se hizo mediante *Southern blot*: éste podría ser uno de los falsos positivos de la prueba *dot blot*.

En nuestro caso, de cuatro muestras, una resultó "falsa positiva" (25%), valor que coincide con el porcentaje de falsos positivos entre *dot* y *Southern blots* reportado por el kit comercial ViraPab empleado en el diagnóstico de PVA

(Bosch, F.X., comunicación personal). El *Southern blot* es considerado el "estándar de oro" de los métodos de hibridación de ácidos nucleicos (Lancaster y Norrild, 1989) en el diagnóstico del PVH por la valiosa información que es capaz de ofrecer, sin embargo es sumamente costoso para propósitos de diagnóstico masivo.

REFERENCIAS

- BOSCH, F.X. y MUÑOZ, N. (1989). Cáncer de cuello uterino: evidencia epidemiológica actual y nuevas hipótesis sobre factores de riesgo. *Revisiones en Salud Pública* 1: 83-110.
- BOSHART, M.; L. GISSMANN; H. IKENBERG; A. KLEINHEINZ; W. SCHEURLLEN y H. ZUR HAUSEN (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3: 1151-1157.
- CRUM, C.P.; H. IKENBERG; R.M. RICHARD y L. GISSMAN (1984). Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N. England J. Med.* 310:880-883.
- FEIBERG, A.P. y B. VOGELSTEIN (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13.
- FUCHS, P.G.; F. GIRARDI y H. PFISTER (1988). Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* 41: 41-45.
- FUCHS, P.G.; F. GIRARDI y H. PFISTER (1989). Human papillomavirus DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases. *Int. J. Cancer* 43: 41-44.
- HALLAM, N., P. GIBSON, J. GREEN y M. CHERNOCK (1989). Detection and typing of Human Papillomavirus infection of the uterine cervix by *dot blot* hybridisation: comparison of scrapes and biopsies. *J. of Medical Virology* 27: 317-321.
- KJAER, S.K. y E. LYNGE (1989). "Incidence, prevalence and time trends of genital HPV infection determined by clinical examination and cytology", en: *Human papillomavirus and cervical cancer*, IARC Scientific Publications No. 94, Lyon, p. 113-124.

- LANCASTER, W.D. y B. NORRILDS (1989). "Diagnosis of HPV by DNA hybridization techniques", en: *Human papillomavirus and cervical cancer*, IARC Scientific Publications No. 94, Lyon, p. 87-103.
- LORINCZ, A.T., G.F. TEMPLE, R.J. KURMAN, A.B. JENSON Y W. D. LANCASTER (1987). Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Nat. Cancer Inst.* 79: 671.
- LORINCZ, A.T.; A.P. QUINN; M.D. GOLDSBOROUGH; B.J. SCMIDT y G.F. TEMPLE (1989). Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J. of Virology* 63: 2829-2834.
- MEISELS, A. (1990). Conferencias sobre infecciones con papilomavirus humanos. Dictadas en el Hospital Hermanos Ameijeiras, La Habana.
- McCANCE, D.J.; M.J. CAMPION; P.K. CLARKSON; P.M. CHESTERS; D. JENKINS y A. SINGER (1985). Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of the cervix. *British J. of Obst. and Gynec.* 92: 1101-1105.
- MUÑOZ, N.; F.X. BOSCH y J.M. KALDOR (1988). Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *Br. J. Cancer* 57: 1-5.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molec. Biol.* 98: 503-517.
- SUGASE, M.; S. MORIYAMA; S. HATA y T. MATSUKURA (1989). Detection of human papillomavirus type 16 DNA and papillomavirus genus specific antigens in vulva and cervix from patients with Bowenoid papulosis. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 19-23.