



Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

**DETECCIÓN Y GENOTIPADO SIMULTANEO DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO: UTILIDAD DE LA MUESTRA
DE ORINA**

TESIS DOCTORAL

Samuel Bernal Martínez

Sevilla 2014



El Dr José Carlos Palomares Folla, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y la Dra Estrella Martín Mazuelos, Profesora Asociada del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada 'DETECCIÓN Y GENOTIPADO SIMULTANEO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: UTILIDAD DE LA MUESTRA DE ORINA', ha sido realizada por Samuel Bernal Martínez y dirigida por los que la suscriben, siendo apta para ser leída ante el tribunal correspondiente, con la aspiración de obtener el grado de Doctor en Farmacia.

Lo que se hace constar a efectos oportunos, en Sevilla a 24^{pe} Septiembre de 2014

Fdo:

Jose Carlos Palomares Folla

Estrella Martín Mazuelos

ÍNDICE

1. INDICE DE TABLAS	6
2. INDICE DE FIGURAS	9
3. INTRODUCCIÓN	11
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS.....	37
6. PLAN DE TRABAJO	39
7. MATERIAL	42
7.1. Pacientes y Muestras Clínicas	43
7.2. Medios de Cultivo	44
7.3. Recipiente para la recogida y transporte de muestras cervicales.....	44
7.4. Citologías (tinción de Papanicolau).....	44
7.5. Extracción de ADN del VPH	44
7.6. Detección del ADN del VPH	46
7.7. Genotipado del VPH.....	49
7.8. Material inventariable	50
8. MÉTODOS	52
8.1. Toma de muestras cervicales para detección del VPH y estudio citológico.....	53
8.2. Toma de Muestras de orina.....	53
8.3. Cultivo de orina	54
8.4. Estudio Citológico.....	54
8.5. Extracción del ADN del VPH para los test AMPLICOR Human Papilloma Virus y Linear Array.....	57
8.6. Amplificación y detección del ADN del VPH con el AMPLICOR Human Papilloma Virus a partir de muestras cervicales	58
8.7. Genotipado del VPH con el test Linear Array	63

8.8. Detección del ADN del VPH con el test Cobas 4800 HPV a partir de muestras cervicales	69
8.9. Detección del ADN del VPH con el test Cobas 4800 HPV a partir de muestras de orina	71
8.10. Estudio Estadístico	72
9. RESULTADOS	74
9.1. Comparación del Cobas 4800 HPV como test único frente a la combinación del los test Amplicor Human Papilloma virus y Linear Array para la detección de los tipos de VPH de alto riesgo en conjunto y genotipado simultaneo de los tipos VPH-16 y VPH-18 en muestras cervicales	75
9.2. Comparación en la detección de ADN del VPH en muestras pareadas de cérvix y orina con el test Cobas HPV 4800.....	83
9.3. Genotipado del VPH en muestras de orina	91
9.4. Evaluación de la detección y genotipado del VPH en muestras de orina respecto del diagnóstico citológico e histológico.....	96
10. DISCUSIÓN	103
11. CONCLUSIONES	122
12. BIBLIOGRAFÍA	125
13. PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	141

1. INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Concordancia en la detección del VPH entre el Cobas Amplicor y el test Cobas HPV 4800 .

TABLA 2. Genotipado individual con Linear Array en las muestras con discrepancia entre el Amplicor y el test Cobas 4800 HPV.

TABLA 3. Resultados del test Cobas 4800 HPV en muestras Cobas Amplicor positivas/ Linear array negativas.

TABLA 4. Discrepancias en el genotipado entre Linear Array y el test Cobas 4800 HPV.

TABLA 5 Tabla de contingencias de la comparación entre el test Cobas 4800 HPV y la combinación Cobas Amplicor y Linear Array.

TABLA 6. Porcentaje de concordancia entre los resultados obtenidos con el test 4800 HPV y la combinación del Cobas Amplicor y Linear Array en relación con los resultados de la citología.

TABLA 7. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia para el total de muestras pareadas cérvix/orina.

TABLA 8. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el volumen de orina procesado.

TABLA 9. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el número de ufc/ml de la orina.

TABLA 10. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el volumen y nº de ufc/ml de la orina.

TABLA 11. Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) en la muestra de orina para la detección del VPH.

TABLA 12. Discrepancias en el genotipado entre muestras de orina y cérvix.

TABLA 13. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en orina para la detección de distintos genotipos de VPH.

TABLA 14. Prevalencia de VPH en muestras cervicales y orinas según diferentes resultados de la citología e histología disponibles.

TABLA 15. Tabla 15 Comparación de la precisión de las muestras de cérvix y orina para la detección de lesiones histológicas \geq CIN 2-3.

2. INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Historia natural del VPH y el cáncer del cuello de útero

Figura 2 Prevalencia de la infección por el VPH, de las lesiones precancerosas y cáncer de cérvix según la edad

Figura 3. Tasa de incidencia de cáncer de cérvix en España en relación con la edad

Figura 4: Clasificación taxonómica del VPH

Figura 5: Estructura del genoma del VPH

Figura 6: Resumen de los métodos comerciales disponibles utilizados para la detección y genotipado del VPH

Figura 7: Componentes básicos del control del cáncer de cérvix

Figura 8: Revelado del genotipado específico con el Linear array

Figura 9: Prevalencia del VPH en muestras de cérvix y orina global y para los genotipos VPH-16 y VPH-18

Figura 10: Prevalencia del VPH tanto en orina como en cérvix según los resultados de la citología y para los genotipos VPH-16 y VPH-18

Figura 11: Prevalencia del VPH en cérvix y orina respecto del diagnóstico histológico \geq CIN2-3

3. INTRODUCCIÓN

En 1998, el premio Nóbel de medicina fue concedido al Dr Herald Zur Hausen por ser el descubridor de la relación entre el cáncer de cérvix y la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Esto constituyó un hito en la medicina, ya que, el cáncer de cérvix provocado por los tipos de VPH 16 y 18 junto con el cáncer de hígado provocado por la infección crónica por el virus de la hepatitis B, son los únicos tipos de cáncer que se pueden prevenir actualmente mediante campañas sistemáticas de vacunación.

El desarrollo del cáncer de cuello uterino es el resultado final de una infección no resuelta por el VPH. El VPH está asociado al 99,7% de los casos de cáncer de cérvix siendo una causa necesaria aunque por sí solo no suficiente para causar dicha patología. La persistencia de una infección por el VPH es esencial para el desarrollo, mantenimiento y progresión de una neoplasia intraepitelial cervical (CIN) de alto grado. En condiciones de inmunocompetencia, el VPH y su expresión citológica, la lesión de bajo grado (LSIL), que se traduce a su vez histológicamente como CIN leve (CIN 1), desaparecen espontáneamente de forma mayoritaria durante los primeros 24 meses, por lo que no deben considerarse lesiones preneoplásicas (1-5). Existe un pequeño porcentaje de mujeres (alrededor del 5%) que no eliminan el virus y por tanto son las que podrían evolucionar a CIN de alto grado (CIN2, CIN3) e incluso a cáncer. Los factores predisponentes para que una infección por VPH persista ó se resuelva, aun no están aclarados. Existen 4 fases en el desarrollo de cáncer del cuello uterino (Fig. 1): La infección por el VPH de la zona de transformación cervical,

la persistencia de dicha infección, la progresión a lesiones precancerosas y finalmente la invasión a través de la membrana basal del epitelio.

Fig. 1: Historia natural del VPH y el cáncer del cuello de útero



A escala mundial, el VPH es responsable de un 5,2% de todos los tumores humanos, pero más del 80% de los casos tienen lugar en países en vías de desarrollo (6,7). En la actualidad se han secuenciado más de 100 tipos de VPH de los cuales alrededor de 40 infectan el área genital y anal, atribuyéndose una capacidad oncogénica especial a los tipos 16,18, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59 (8). Pero no todos los genotipos son iguales respecto a su asociación con el cáncer cervical. Según los datos de un metanálisis reciente sobre 10575 casos de cáncer de cérvix, alrededor del 70% estaban asociados con los tipos 16 y 18 del VPH (9).

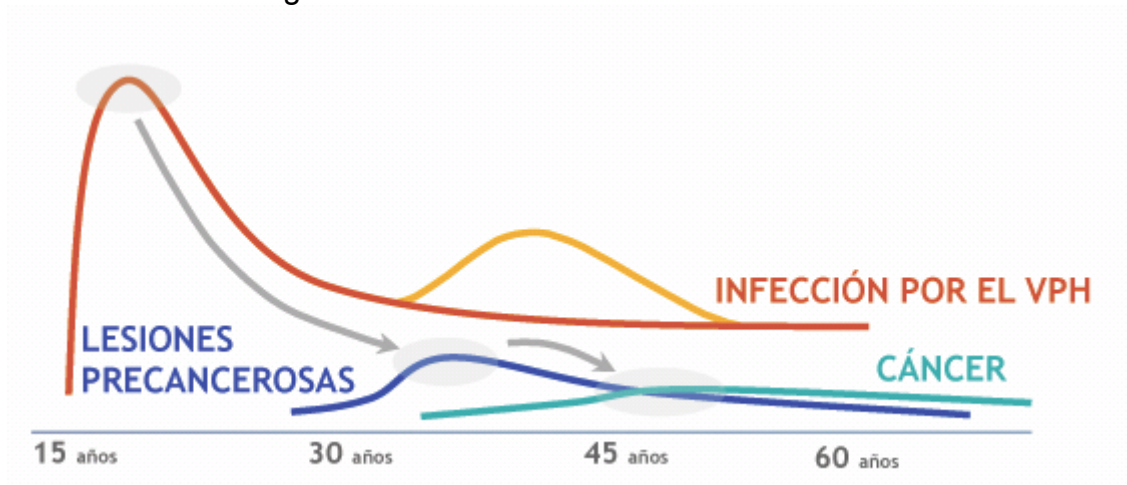
Además el VPH no solo produce cáncer a nivel del cuello uterino. Una evaluación reciente de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) sobre el papel causal de

distintos agentes infecciosos en cánceres humanos estableció que hay evidencia suficiente para clasificar el VPH-16 como virus oncogénico asociado a cánceres en localizaciones anogenitales distintas al cuello uterino, como la vulva, la vagina, el ano y el pene, con distintas fracciones atribuibles (40%, 70%, 84% y 47%, respectivamente); y también a cánceres de orofaringe (10).

El VPH es un pequeño virus que se transmite sexualmente, siendo la infección de transmisión sexual (ITS) más común entre las mujeres. El virus infecta a las mucosas del cérvix, vagina, vulva y ano (11). Se estima que la prevalencia de infección por VPH en la población femenina es inferior al 10% en los países desarrollados y al 15% en países en vías de desarrollo y esta prevalencia varía según las áreas geográficas siguiendo una distribución similar a la de cáncer de cuello uterino (11). La prevalencia del VPH se asocia a la edad (Fig. 2), siendo más alta al inicio de las relaciones sexuales y responde al patrón de comportamiento sexual de la comunidad. En las mujeres con citología normal el pico de prevalencia de infecciones transitorias por tipos oncogénicos del VPH (línea roja) se muestra entre la adolescencia y antes de los 30 años, justo después del inicio de las relaciones sexuales, pudiendo llegar al 30-40% en mujeres menores de 25 años. Tras este pico, hay una disminución marcada hasta valores entre 3-10% (12). En algunas poblaciones se observa un segundo pico más moderado (línea naranja) en las mujeres de mediana edad cuya interpretación está siendo objeto de estudio (13, 14). En las regiones que disponen de programas de cribado por citología, el pico de prevalencia de las lesiones precancerosas se observa 10 años más tarde (línea azul). En las mujeres con cáncer invasivo de cuello uterino el pico de prevalencia del VPH

se produce entre los 45 y los 55 años (línea verde). Las mujeres con cáncer de cuello uterino y con infección por el VPH 16, 45 y 18, son más jóvenes que las que están infectadas por cualquier otro tipo único de VPH.

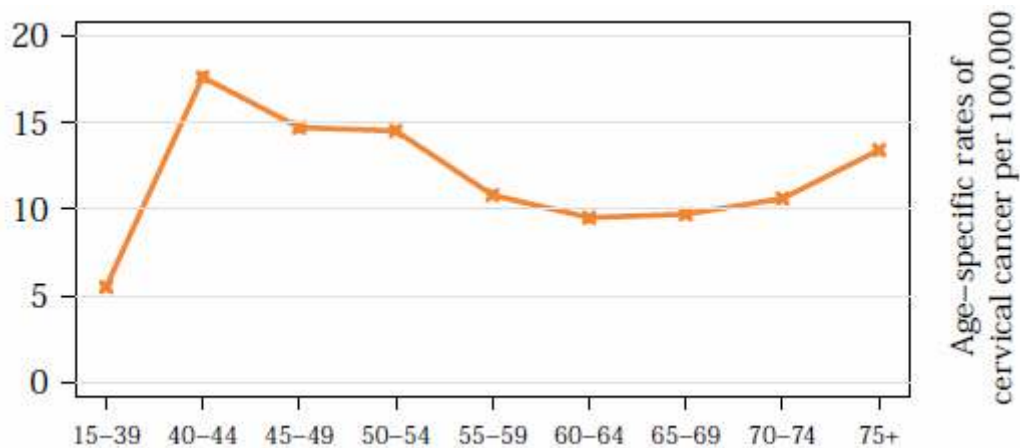
Fig. 2: Prevalencia de la infección por el VPH, de las lesiones precancerosas y cáncer de cérvix según la edad



En España la prevalencia del VPH en mujeres de la población general es del 21% en menores de 25 años, observándose un descenso gradual con la edad hasta llegar a valores inferiores al 4% en mujeres mayores de 65 años (15).

Por otra parte, según los datos comunicados por los registros de Cáncer españoles a la IARC dependiente de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) (15) en España la incidencia de cáncer de cuello uterino se halla en el segmento bajo europeo con un pico de incidencia entre los 40 y 44 años (Fig.3).

Fig. 3: Tasa de incidencia de cáncer de cérvix en España en relación con la edad



Las tasas de mortalidad por cáncer ajustadas a población europea han sido publicadas por el Centro Nacional de Epidemiología (C.N.E.) en el proyecto Ariadna (16). La media española de mortalidad por cáncer de cuello uterino en el año 2007 fue de 2,13 x 100.000 mujeres. En la última estimación de 2014 la tasa de mortalidad se ha estimado en 3,2 x 100000 mujeres (15).

En Andalucía, según los datos recogidos en el Proceso Asistencial Integrado (PAI) (17) de “Cáncer de cérvix” de 2010 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, la mortalidad por cáncer de cuello uterino ajustada a población europea en las provincias andaluzas es la siguiente:

Granada: 0,97 / 100.000 mujeres

Córdoba: 1,13 / 100.000 mujeres

Cádiz: 1,70 / 100.000 mujeres

Sevilla: 1,70 / 100.000 mujeres

Málaga: 1,76 / 100.000 mujeres

Almería: 2,04 / 100.000 mujeres

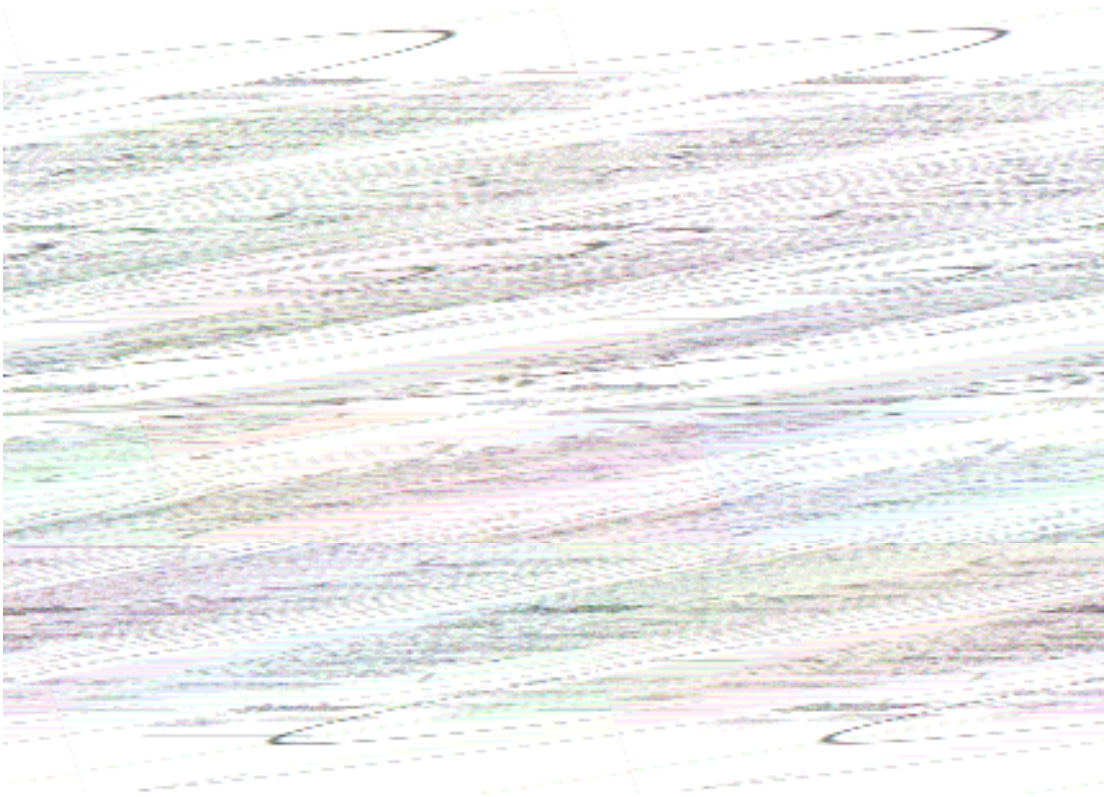
Jaén: 2,71 / 100.000 mujeres

Huelva: 4,49 / 100.000 mujeres

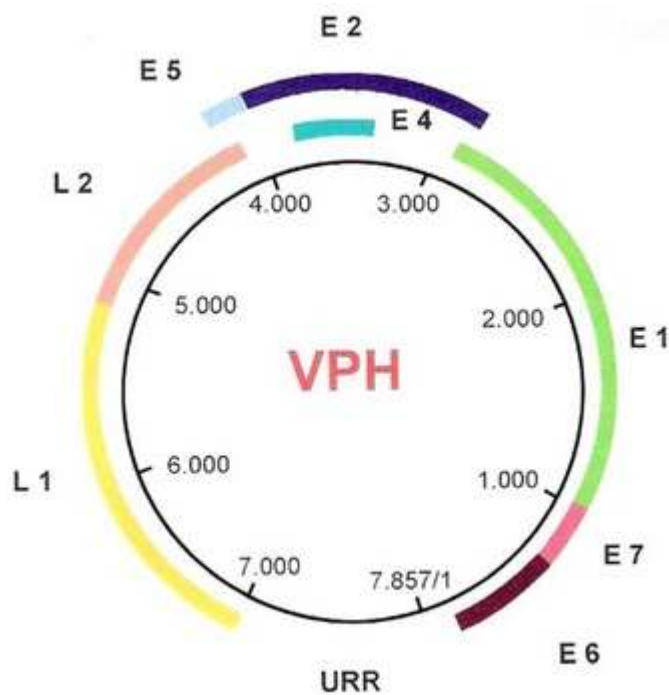
3.1. Estructura del virus

El VPH es un virus de ADN de doble cadena circular con cápside icosaédrica cuyo genoma está compuesto por 8.000 pares de bases. La clasificación taxonómica más reciente es la del séptimo Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) que los agrupa en la familia Papillomaviridae. Dentro del género se clasifican por similitudes en su genoma en 5 géneros (Alpha, Beta, Gamma, Mu y Nu) y 33 especies (18,19). Aproximadamente 40 tipos diferentes de VPH del género más importante desde el punto de vista clínico, el género alpha, son capaces de infectar las mucosas, y de ellos un subgrupo de 10-15 tipos está asociados con lesiones que pueden progresar a cáncer (1-5).

Fig. 4: Clasificación taxonómica del VPH



A pesar de su pequeño tamaño su estructura molecular es muy compleja. El genoma está compuesto por 10 regiones codificadoras o de transcripción (ORF) y una no codificadora.

Fig. 5: Estructura del genoma del VPH

Las secuencias codificadoras se hallan en una de las cadenas del ADN y se designan tempranas (early), E1-E8, y tardías (late); L1-L2. Las proteínas tempranas son polipéptidos no estructurales, mientras que las proteínas codificadas por L1 y L2 son las que formarían la cápside. La función de los genes reguladores es (20):

Región	Función de la proteína codificada
E1	Relacionada con la replicación plasmídica
E2	Reguladora de la transcripción
E3	Desconocida
E4	Colapso de la red de citoqueratina y liberación del virus
E5	Transformación neoplásica

E6	Transformación neoplásica
E7	Transformación neoplásica
E8	Desconocida

Un genotipo nuevo es el que tiene más de un 10% de diferencia de nucleótidos del gen L1 con respecto a los ya existentes. Si la disimilitud es del 2-10% se considera un subtipo, y si es inferior al 2%, variante (18,19).

3.2. Diagnóstico de la infección por VPH

El VPH no ha podido ser recuperado en cultivos celulares convencionales y los ensayos serológicos tienen una fiabilidad limitada. La infección por VPH provoca una respuesta inmune humoral contra la proteína mayor de la cápside con los anticuerpos, permaneciendo detectables durante muchos años (21). Por tanto, con el diagnóstico serológico, es imposible diferenciar entre infecciones presentes y pasadas. Como consecuencia de lo anterior, actualmente el método de referencia para el diagnóstico de la infección por VPH se considera la detección de su ADN mediante técnicas moleculares (22,23). Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para el diagnóstico de la infección por VPH, algunas de las cuales ya están comercializadas y aprobadas por la FDA (23). No obstante, se ha observado que los diferentes métodos de detección del VPH presentan diferente sensibilidad y especificidad para la detección de lesiones precancerosas (24). Recientemente Meijer y cols (25) han formulado las directrices internacionales que describen las condiciones que debe cumplir un método molecular de detección del VPH para

que pueda utilizarse como primera línea en el cribado del cáncer de cuello uterino. Estas condiciones son:

- Sensibilidad clínica para lesiones \geq CIN2 no menor del 80% respecto de la técnica de captura de híbridos.
- Especificidad clínica para lesiones \geq CIN2 no menor del 98% respecto de la técnica de captura de híbridos
- Alta reproductibilidad intra e interlaboratorios, con un límite inferior de confianza del 87% o superior

Las técnicas moleculares para el diagnóstico de la infección por VPH se pueden dividir en dos grupos:

- 1) Técnicas de amplificación de la señal.
- 2) Técnicas de amplificación de una diana.

Fig. 6: Resumen de los métodos comerciales disponibles utilizados para la detección y genotipado del VPH

Categoría	Diana	Principio de la prueba	Método
Amplificación de Dianas	ADN	PCR	*PGMY-Linear array ^a
			PGMY-CHUV (WHO HPV LabNet) ^a
			GP5+/6+ PCR RLB ^a
			SPF10-liPa (DDL) ^a
			GP5+/6+ PCR-EIA ^b
			MGP PCR-Luminex
			BSGP5+/6+-PCR-MPG
			Digene HPV genotyping RH test (Qiagen)
			Digene HPV genotyping LQ test (Qiagen)
			Amplicor (Roche)
			Papillocheck (Greiner Bio-One)
			CLART HPV2 (Genómica) ^a
			PCR en tiempo real
	Cobas 4800 HPV test (Roche) ^b		
ARNm	RT-PCR	HPV16 E6*IRT-PCR-EIA	
		NASBA	ProTec HPV Proofer assay (Norchip)
			NucliSENS EasyQ HPV (Biomerieux)
		TMA	Aptima HPV assay ^b
Amplificación de señales	ADN	Fase Líquida	Hybrid Capture (Qiagen) ^b
			Cervista HR HPV (Hologic) ^b
		In situ	Ventana Inform HPV (Ventana)
			Dako Gen point (Dako)

a: Validado analíticamente para el genotipado del VPH para estudios epidemiológicos y vigilancia virológica.

b: Clínicamente validado y autorizado por la FDA para el cribado cervical

c: Clínicamente validado y autorizado por la FDA para la detección de tipos del VPH de alto riesgo en mujeres con ASCUS en la citología

1) Técnicas de amplificación de la señal

La principal técnica basada en la amplificación de la señal es la técnica de captura de híbridos II (Digene Corp., USA). Es un método no radiactivo basado

en la hibridación de un fragmento diana del ADN del VPH con sondas de ARN marcadas en solución. El híbrido ADN-ARN resultante es capturado en una placa de microtiter y detectado con anticuerpos monoclonales y un sustrato quimioluminiscente proporcionando una medida semicuantitativa del ADN del VPH. Este ensayo ha sido ampliamente validado clínicamente en grandes estudios de cribado longitudinales (26,27). Está aprobado por la FDA y disponible comercialmente. Este método se usa como referencia para la comparación de otros métodos moleculares de detección de VPH (25). Recientemente ha salido al mercado una nueva versión de esta técnica que permite el genotipado simultáneo de los tipos VPH-16, VPH-18 y VPH-45. Este kit posee el marcado CE aunque aun no está aprobado por la FDA. El límite de detección es de 5000 copias de genoma lo cual lo hace menos sensible que las técnicas de PCR y están descritos reactividades cruzadas con tipos de VPH de bajo riesgo.

En este grupo de amplificación de las señales se encuentra el Cervista HPV16/18 test (Hologic, Madison,WI), también aprobado por la FDA desde 2009.

2) Técnicas de amplificación de la diana

2.1 Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es el método de amplificación utilizado más ampliamente en la actualidad. Se basa en un proceso cíclico de temperaturas y el empleo de

cebadores oligonucleotídicos que flanquean la región o diana del ADN de interés en presencia de una ADN polimerasa termoestable. Dentro de las técnicas basadas en la PCR existen dos estrategias:

2.1.1 PCR convencional

En estas técnicas, tras utilizar diversos cebadores, el producto de la amplificación es detectado mediante diversas técnicas bien de RFLP, hibridación con sondas oligonucleotídicas, hibridación en placas de microtiter, secuenciación directa o hibridación reversa.

La mayoría de estas técnicas basadas en la PCR convencional son técnicas caseras no comercializadas (28). La técnica Amplicor HPV (Roche Diagnostic, España) es la más ampliamente utilizada. Está disponible comercialmente, y aprobada por la FDA y en diversos estudios se ha demostrado comparable a la técnica de captura de híbridos (29-31).

Otra de las técnicas basadas en la PCR es la de Linear Array (Roche Diagnostic, España). Consiste en hacer primero una PCR convencional con cebadores biotinilados. El producto de PCR de doble cadena se desnaturaliza bajo condiciones alcalinas y se añade a una tira de nitrocelulosa revestida con sondas específicas para cada tipo de VPH y α -globina en un buffer de hibridación. Después de la hibridación, los híbridos pueden ser detectados añadiendo un conjugado con estreptoavidina y un substrato, generando un color en el lugar de la sonda que puede ser interpretado visualmente. Este método

es particularmente útil para detectar genotipos específicos así como para detectar infecciones mixtas causadas por más de un genotipo. También está disponible comercialmente, y en diversos estudios se ha demostrado comparable a la técnica de captura de híbridos (32,33).

2.1.2 PCR a tiempo real

Consiste en combinar cebadores PCR específicos con sondas fluorescentes para la detección en tiempo real de los productos de amplificación. Esta tecnología permite una disminución considerable en el tiempo del diagnóstico de la infección por el VPH ya que amplificación y detección se hacen simultáneamente y además el riesgo de contaminación por amplicones es mucho menor.

Entre los tests basados en la PCR tiempo real, están el test Cobas HPV 4800 (Roche) que es un método comercial que está completamente automatizado a partir de la muestra primaria para realizarlo en el equipo Cobas 4800 (Roche). Este test además permite distinguir entre tipos de VPH de alto y bajo riesgo y detecta simultáneamente y de forma específica y separada los tipos VPH-16 y VPH-18. A partir del estudio ATHENA, la prueba Cobas 4800 HPV ha sido clínicamente validada para la detección sistemática del cáncer de cérvix y ha sido aprobada por la FDA (34). El test además ha sido ampliamente evaluado en varios estudios recientes (35-39).

Otro test basado en la PCR a tiempo real es el Abbott RealTime High-Risk HPV. Este test también detecta simultáneamente y por separado los tipos 16, 18 y el conjunto del resto de los tipos de alto riesgo y también está validado desde 2009 (40, 41).

3.3. Genotipado del VPH

Los más de 100 tipos de VPH secuenciados se pueden clasificar de diversas formas (18,19). Según su tropismo, se pueden separar en cutáneos ó mucosos, pero desde el punto de vista clínico, la clasificación más interesante es aquella que los separa en función de su capacidad para inducir lesiones precancerosas de cérvix. En este sentido se dividen en cuatro grupos:

- Tipos establecidos como de alto riesgo, considerados como carcinógenos humanos conocidos (VPH- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 59). Los tipos del VPH 16 y 18 son la causa del 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino.
- Tipos de riesgo alto probable, considerados como probablemente carcinógenos (VPH-68)
- Tipos de riesgo alto posible, considerados como posiblemente carcinógenos (VPH- 26, 30, 34, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 85 y 97)
- Tipos de bajo riesgo, considerados como no carcinógenos y asociados principalmente a verrugas genitales y a epitelio normal (VPH-6 y VPH-11)

La importancia del genotipado específico o individual es muy grande desde el punto de vista epidemiológico. Medir el impacto de las campañas de vacunación e investigar el reemplazo de los tipos de VPH tras la reducción drástica de los tipos 16 y 18 previstas. Por otra parte, tiene gran interés el conocer la prevalencia de los tipos de VPH circulantes como guía para la introducción de vacunas profilácticas más eficaces y que sean costo-beneficio.

Desde el punto de vista clínico, el genotipado específico es la única manera de conocer la persistencia de un tipo específico de VPH a lo largo de varias determinaciones separadas en el tiempo. Permite, además, identificar infecciones mixtas cuyo significado está aun por aclarar y por último, es fundamental a la hora de establecer protocolos de seguimiento a las mujeres, priorizando la realización de colposcopias y acortando los intervalos de seguimiento a aquellas mujeres que están infectadas por tipos de VPH de alto riesgo respecto a las que no están infectadas y dentro de aquéllas, las que están infectadas por los tipos 16 y/o 18.

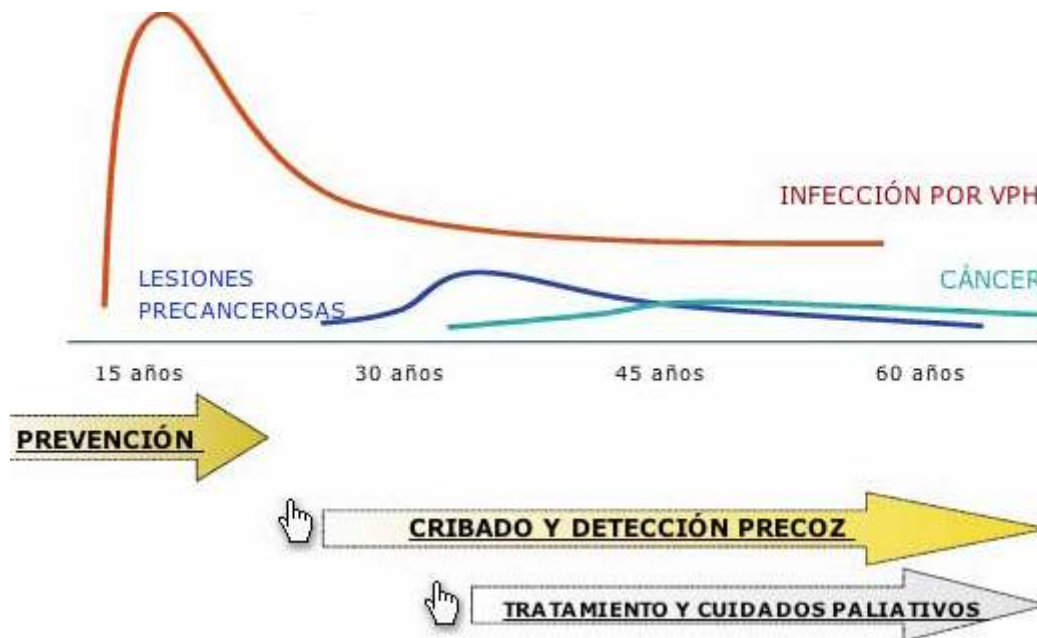
Actualmente existen en el mercado diversos kits comerciales para realizar el genotipado. Aunque tienen el marcado CE, aun no hay ninguno aprobado por la FDA (fig.6)

3.4. Prevención del cáncer de cérvix

Hay 4 componentes básicos del control del cáncer de cérvix: la prevención primaria, la detección precoz (mediante programas de cribado y detección

precoz), el diagnóstico propiamente dicho y tratamiento oncológico, así como los cuidados paliativos en edades avanzadas (Fig. 7)

Fig. 7: Componentes básicos del control del cáncer de cérvix



Actualmente la mejor forma de prevención del cáncer de cérvix es a través de campañas de prevención primaria. La prevención primaria significa la prevención de la infección por VPH y los co-factores que aumentan el riesgo de cáncer de cuello uterino, e incluye:

- Educación y sensibilización para reducir los comportamientos sexuales de alto riesgo.
- Aplicación de estrategias adecuadas a nivel local para modificar estos comportamientos.
- El desarrollo y la introducción de vacunas contra el VPH eficaces y asequibles.

- Acciones para incentivar el abandono del consumo de tabaco (que es un factor de riesgo conocido para el cáncer de cuello uterino y otros).

Hoy día ya se dispone de 2 vacunas muy eficaces para prevenir la infección por los tipos de VPH 16 y VPH 18 que son los causantes de hasta el 70% de los cánceres de cérvix. Estas vacunas son eficaces cuando se administran a jóvenes preadolescentes antes del inicio de las relaciones sexuales (42). No obstante están apareciendo publicaciones que sugieren que se pueden vacunar las mujeres incluso después del comienzo de las relaciones sexuales (43).

En mujeres sexualmente activas no vacunadas, la mejor forma de prevenir el cáncer cervical es a través de programas ginecológicos organizados de cribaje, con tratamiento asociado en aquellos casos en los que se detecten lesiones precancerosas. Ningún otro tipo de cáncer ilustra mejor que el cáncer de cuello de útero los notables efectos que un diagnóstico precoz y un tratamiento preventivo tienen sobre las tasas de mortalidad. La introducción hace más de 50 años, del cribado mediante citología cervical, ha supuesto uno de los mayores éxitos en la historia de prevención del cáncer. En países desarrollados, su implantación ha permitido una reducción en las últimas décadas del 70-80% de la incidencia del cáncer de cuello uterino (44-46). En España se ha estimado que hasta el 80% de mujeres con cáncer invasivo de cérvix carecían de una historia previa de citologías (47).

Estos programas de cribado deben ser desarrollados sistemáticamente. Idealmente, deberían tener una elevada sensibilidad que permita evitar la aparición de neoplasias a partir de la progresión lesiones preneoplásicas (tipo CIN) y una elevada especificidad para evitar el sobretratamiento de lesiones de bajo grado que con toda probabilidad se curarán espontáneamente y que dan lugar a una elevadísima carga asistencial, con seguimientos excesivamente frecuentes a mujeres, y aumento de procedimientos ginecológicos (colposcopias, biopsias y tratamientos) en muchas ocasiones innecesarios o redundantes.

Durante más de 50 años la citología cervical mediante la tinción de Papanicolau ha sido el “Standard of care” en los programa de cribado del cáncer de cérvix (44-46). Con la citología, lo que se pretende es detectar cambios celulares anormales o lesiones premalignas en tejidos cervicales, de modo que se pueda actuar sobre la mujer antes de progresar al cáncer. Aunque no hay ensayos clínicos dirigidos que hayan demostrado una relación directa entre la citología y la reducción de la incidencia de cáncer, no hay duda que el cribado mediante citologías y seguimiento de las mujeres con resultados patológicos ha sido la causa de dicha reducción. Sin embargo, el cribado mediante una citología cervical presenta una serie de inconvenientes: una baja sensibilidad ya que solo detecta el 50-60% de los casos de CIN3 (34,48). Además, requieren una cierta infraestructura sanitaria para atender a las pacientes, y a pesar de los intentos de estandarización y de los criterios de Bethesda (49), está sujeta a errores técnicos y de interpretación subjetiva resultando en resultados falsamente negativos (50,51). Además la citología

presenta problemas de implementación de programas de control de calidad, especialmente en países con pobres recursos económicos. Otro inconveniente son los adenocarcinomas cervicales, los cuales, están más estrechamente asociados al tipo VPH 18, cuyas tasas se han mantenido o incluso han aumentado en los últimos años ya que la citología detecta pobremente las lesiones producidas por este tipo de virus (52,53). Por tanto los programas de cribado basados únicamente en la citología para ser eficaces, requieren la realización de revisiones periódicas cada poco tiempo. Este es un problema que afecta sobre todo a países con bajos recursos, de población mayoritariamente rural, cuyas mujeres pueden ser cribadas en pocas ocasiones a lo largo de sus vidas.

Posteriormente, se introdujeron en los programas de cribado las pruebas de detección del ADN del VPH en muestras cervicales mediante técnicas moleculares. Estas técnicas presentan una sensibilidad muy superior a la citología aunque son menos específicas para la detección de lesiones precancerosas CIN2 ó superiores. Actualmente, el valor predictivo negativo (VPN) de los tests de VPH para la detección de CIN2+ es aproximadamente un 6% superior al resultado negativo de una citología, permitiendo teóricamente, alargar los intervalos de seguimiento en varios años (54-59). En un estudio derivado del ensayo ATHENA se ha demostrado que la tasa acumulativa de incidencia de lesiones tipo > CIN3 a los 3 años en mujeres VPH negativas es menos de la mitad que la de las mujeres con citología negativa. Además la realización de ambas pruebas (citología y VPH) tuvo escaso beneficio respecto

a la realización de la prueba del VPH sola (60,61). Este hecho ha sido avalado además mediante estudios de coste-efectividad y coste-eficiencia (62,63).

No obstante, los programas de cribado actuales de diferentes sociedades americanas aun recomiendan comenzar el cribado con citología mediante la tinción de Papanicolau a la edad de 21 años y repetirlos cada 3 años hasta los 29 años. A partir de los 30 años se recomienda el uso combinado de citología y prueba de VPH con intervalos de seguimientos cada 5 años si ambos test son negativos y terminar el cribado a los 65 años (64).

El protocolo de cribado del cáncer de cérvix en mujeres no vacunadas de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) (65) solo se diferencia de los americanos en que propone iniciar el cribado mediante citologías a partir de los 3 años de inicio de las relaciones sexuales.

Teóricamente sería posible reducir costes al utilizar una técnica seguida de otra en función de los resultados de la primera. La citología seguida del test de VPH ha sido muy empleada pero tiene los problemas anteriormente comentados. Puesto que las pruebas de detección del VPH son más sensibles aunque menos específicas que la citología, parece más lógico primero realizar una prueba de VPH y en los casos que sean positivos realizar posteriormente los tests citológicos o el genotipado específico. Ya, en algunos países como Holanda (67) ya se ha impuesto en los nuevos algoritmos de cribado la inclusión del test de VPH como prueba inicial de cribado frente a la clásica repetición de la citología disminuyendo costes al distanciar el control en las

mujeres negativas. Pero esta estrategia también puede aumentar los costes si la detección de VPH se realizara en población con alta incidencia de la infección, como en las mujeres jóvenes. De ahí que en los diversos programas se establezcan edades superiores a 30-35 años para una relación coste-eficacia adecuada de la prueba de VPH (62-64).

Sin embargo, estos programas de cribado tienen algunos problemas de implementación. En primer lugar los programas se basan en la realización de exámenes pélvicos, que es un procedimiento invasivo, desagradable para la mujer, que requiere mucho tiempo y una cierta infraestructura sanitaria que no es fácilmente accesible en países con pocos recursos (67,68). Por otra parte hay un porcentaje no despreciable de mujeres que por motivos culturales, religiosos, personales, etc...son reacias a someterse a una exploración ginecológica.

Por tanto, el desarrollo de métodos no invasivos de recogida de muestras, que puedan ser incorporados en los programas de cribado cervical, tendría la enorme ventaja de mejorar la aceptación de dichos programa con una mayor cobertura poblacional e incluso más efectivas como ya ha sido demostrado con autotoma de muestras vaginales (69-74)

La utilización de otras muestras, por ejemplo la orina, como indicador indirecto de la presencia del VPH en cérvix es una alternativa prometedora que ya ha sido utilizada en conjunción con técnicas moleculares para el diagnóstico en

rutina de otras enfermedades de transmisión sexual como las producidas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (75-77)

En este sentido, se han desarrollado diferentes ensayos para la detección del VPH en muestras de orina en diferentes grupos de riesgo de infección como por ejemplo personas VIH positivos, adolescentes y mujeres jóvenes, mujeres con citología anómala y cáncer, así como en hombres y en varones atendidos en centros de infecciones de transmisión sexual (78-98). Sin embargo los resultados publicados varían significativamente y a menudo son muy inconsistentes debido a problemas asociados a la recogida de las muestras y su procesamiento, a los métodos utilizados para la extracción de ADN, a las técnicas de amplificación y detección utilizadas (en su mayoría técnicas caseras) así como diferentes grupos de población estudiados. Diferentes autores han intentado realizar metaanálisis de dichos estudios llegando a la conclusión que es imposible sacar conclusiones válidas (99-101).

El uso de muestras de orina en el programa de cribado de cáncer de cérvix permitiría un aumento de la cobertura poblacional (mayor accesibilidad y facilidad de toma). Además aumentaría el confort de la mujer salvando barreras culturales, religiosas, etc...que dificultan la toma de exudado cervical, rechazada por múltiples etnias y creencias religiosas. Además la utilización de la orina tendría una gran utilidad para realizar estudios epidemiológicos de prevalencia a gran escala (92,102). Todo ello da lugar a una optimización de los recursos y una mejora de la eficiencia que podría ser aplicable a nuestro entorno sanitario.

4. HIPÓTESIS

La introducción de la tecnología de PCR a tiempo real para la detección del ADN del VPH junto con el genotipado simultáneo de los tipos 16 y/o 18 en una única prueba, podría disminuir el tiempo de espera de resultados y ayudar a estratificar a las mujeres que están siguiendo un programa de cribado de cáncer de cérvix, priorizando a aquellas que estén en una situación de mayor riesgo de desarrollo de lesiones precancerosas respecto a otras mujeres con menor riesgo o sin riesgo (negativas para VPH o con tipos de bajo riesgo).

La validación y estandarización de la técnica de PCR a tiempo real para la detección del VPH en una muestra no invasiva como la orina que pueden recoger las propias mujeres, puede favorecer un aumento de la cobertura poblacional así como una optimización del tiempo de las consultas de ginecología, por tanto reduciendo costes y pudiendo aplicarse en áreas con escasos recursos sanitarios al no requerir una infraestructura sanitaria compleja.

5. OBJETIVOS

1. Comparar en muestras de exudado cervical los resultados de la detección de los tipos de VPH de alto riesgo en conjunto y el genotipado simultáneo de los tipos VPH-16 y VPH-18 mediante una técnica de PCR a tiempo real automatizada (Cobas 4800 HPV test Roche Diagnostic), frente a la combinación de una técnica de PCR convencional para la detección del VPH alto riesgo con el test Cobas Amplicor (Roche Diagnostic) seguida una técnica de hibridación reversa (Linear Array Roche Diagnostic) para el genotipado individual.
2. Validar la muestra de orina como muestra adecuada para la detección y genotipado simultáneo del ADN del VPH mediante una técnica de PCR a tiempo real totalmente automatizada y estandarizada, empleando el test Cobas HPV 4800, comparando sus resultados con los obtenidos en las correspondientes muestras cervicales pareadas
3. Validar la eficacia de la muestra de orina para la detección de lesiones pre-neoplásicas.

6. PLAN DE TRABAJO

La realización de todas las técnicas de detección y genotipado del VPH tanto en muestras cervicales como en las orinas se hicieron en el laboratorio de Microbiología de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología (UCEIM) del Hospital Universitario de Valme de Sevilla. Los procedimientos y exámenes de citología y biopsias se realizaron en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Valme.

Se analizaron muestras de mujeres derivadas desde atención primaria a la consulta de diagnóstico precoz de la Unidad de Gestión Clínica de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Valme por resultados anómalos de citología. En la consulta se realizó nuevamente una toma de muestra para realizar la citología y una toma de muestra para detección del VPH según el procedimiento del laboratorio de Microbiología. Siguiendo el criterio del ginecólogo, se realizó además una colposcopia y biopsia según el protocolo habitual de dicha consulta.

En primer lugar se compararon los resultados en muestras cervicales entre la PCR convencional con la técnica Amplicor HPV (Roche Diagnostic) seguida del genotipado específico con el test Linear array (Roche Diagnostic) frente a la detección y genotipado simultáneo para los tipos de VPH 16 y 18 mediante PCR a tiempo real con el test HPV Cobas 4800 (Roche Diagnostic).

Se analizaron el porcentaje de concordancia y el índice de correlación kappa de Cohen así como las discordancias encontradas en diferentes situaciones:

- Todas las muestras estudiadas
- Concordancia según el resultado de la citología

En segundo lugar, para la validación de la muestra de orina en el programa de cribado, se aplicó la técnica de PCR a tiempo real con el test HPV Cobas 4800 en muestras pareadas de orina y cérvix de mujeres atendidas en la consulta de diagnóstico precoz de la Unidad de Gestión Clínica de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Valme. Para la recolección de la orina se avisó a las mujeres para que, previamente a la consulta ginecológica, recogieran a primera hora de la mañana una muestra de la primera parte de la micción en un bote estéril. Se consideró como “gold standard” los resultados obtenidos en las muestras cervicales.

Se analizó la Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo e Índice de correlación Kappa de Cohen para diferentes situaciones:

- Volumen de muestra de orina procesado: centrifugación ó no
- Condiciones microbiológicas (Recuento de unidades formadoras de colonias por ml) de la orina recibida
- Comparación según genotipos detectados
- Comparación en diferentes resultados de la citología cervical
- Comparación frente a diagnóstico histológico final

7. MATERIAL

7.1. Pacientes y Muestras Clínicas

8.1.1 Comparación del Cobas 4800 HPV como test único frente a la combinación del los test Amplicor Human Papilloma virus y Linear Array para la detección de los tipos de VPH de alto riesgo en conjunto y genotipado simultaneo de los tipos VPH-16 y VPH-18 en muestras cervicales

Se estudiaron 340 mujeres procedentes de atención primaria derivadas a la consulta de diagnóstico precoz de cáncer de cérvix del Hospital Universitario de Valme por resultados anómalos de una citología. Como parte de la asistencia habitual, a todas las mujeres se les realizó una toma de muestra de exudado de cérvix para estudio citológico y una toma para estudio de VPH por el método habitual del laboratorio de Microbiología.

8.1.2 Detección del VPH en muestras de orina mediante una técnica de PCR a tiempo real con el test Cobas 4800 HPV

Empleamos 145 muestras pareadas de exudados cervicales y orinas recogidas el mismo día de mujeres derivadas a la consulta de alto riesgo de cáncer de cérvix de la unidad de Ginecología del Hospital Universitario de Valme. Se seleccionaron mujeres que eran sexualmente activas, no estaban embarazadas y tenían entre 21 y 65 años. Todas las mujeres firmaron un consentimiento informado escrito antes de someterse al estudio.

7.2. Medios de Cultivo

Agar sangre Columbia (bioMerieux España)

7.3. Recipiente para la recogida y transporte de muestras cervicales

Medio PreservCyt Solution (Cytoc Corporation, Boxborough, MA, USA)

7.4. Citologías (tinción de Papanicolau)

- Citospray: para fijar las muestras
- Hematoxilina: es la tinción nuclear que permite básicamente revelar los núcleos de las células presentes en la muestra..
- Orange G: es un colorante sintético de carácter ácido que revela compuestos básicos como la prequeratina (que tiñe de color rosado) o la queratina (que tiñe de color naranja brillante).
- Eosina amarillenta: tiñe de color rosa-anaranjado el citoplasma de las células escamosas maduras, de las células ciliadas y de los eritrocitos.
- Verde Luz SF amarillento: tiñe de color verde-azulado las células escamosas no superficiales (inmaduras o a parcialmente maduras).
- Pardo Bismark R: no tiñe el citoplasma celular pero si la mucina.
- Ácido fosfotúngstico: tiene una función mordiente, especialmente importante para el Verde Luz SF.

7.5. Extracción de ADN del VPH

COBAS® Ampliprep Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España)

Método automatizado para la extracción del ADN del VPH de una muestra de exudado cervical con el equipo Cobas Ampliprep para su posterior amplificación y detección con el kit Amplicor.

La preparación ó extracción del ácido nucleico de la muestra se hace empleando técnicas de sondas de ADN de captura. El Ampliprep emplea temperaturas elevadas y un agente caotrópico para liberar el ácido nucleico de las partículas virales y protegerlo de las Nasas presentes en el suero o plasma. La muestra junto con el estándar (QS ó IC) se mezcla con un reactivo de lisis (CS2) y una sonda biotinilada (CS3). Entonces desciende la temperatura para permitir la hibridación del ácido nucleico viral y del estándar con la sonda biotinilada. Se forma un complejo que se une con unas partículas magnéticas revestidas de estreptoavidina (CS1). El sistema, entonces separa los complejos ácido nucleico (ADN/ARN)-biotina-estreptoavidina-partícula magnética del resto de la mezcla de reacción y posteriormente hace un lavado de las partículas. La muestra ya está preparada y ya puede ser procesada.

Reactivos incluidos en el kit

TNAI CS1: Partículas magnéticas revestidas de estreptoavidina

TNAI CS2: Reactivo de lisis

TNAI CS3:

Solución de proteasa

Buffer de elución

TNAI CS4: Diluyente de muestra

TNAI IC/QS: Diluyente del Control interno

TNAI Wash Reagent

7.6. Detección del ADN del VPH

AMPLICOR Human Papilloma Virus (HPV) Test (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España)

El test Amplicor HPV se basa en una amplificación mediante PCR del ADN diana utilizando cebadores biotinilados específicos de la región polimórfica L1 del genoma del VPH. Los cebadores están diseñados para amplificar el ADN de 13 genotipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Para asegurar la calidad de la muestra recibida en términos de celularidad, adicionalmente hay una pareja de cebadores para co-amplificar una secuencia del gen de la α -globina humana. Después de la PCR, los productos amplificados se hibridan con una sonda oligonucleotídica. El híbrido se revela con un sustrato colorimétrico y se mide la densidad óptica a 450 nm. Se considera positivo cuando la absorbancia es mayor de 0.2. Si la muestra y su control interno de α -globina no amplifica se considera un resultado inválido.

Los reactivos incluidos son:

Amplilute Liquid Media extraction Kit (EXTRN I) 50 test

CAR (tapón rojo). 1 vial

Buffer AVE (tapón morado) 4 viales de 2 ml

Buffer ATL 2 viales de 10 ml

AMPLICOR HPV Controls kit (HPVCJL)

Control positivo 4 viales de 0.5 ml

Control negativo 4 viales de 0.5 ml

AMPLICOR HPV Amplification Kit I (HPV AMP I) 96 test

HPV MgCl₂ 4 viales de 0.15 ml

HPV MMX 4 viales de 1.25 ml

AMPLICOR HPV Detection kit (HPV MWP DK I) 96 test

DN (1) 1 vial

HPV (2) HYB 2 viales

AV HRP (3) 2 viales

SUB A (4 A) 2 viales

SUB B (4 B) 2 viales

STOP (5) 2 viales

Placas de celdillas

HPV MWP (12 tiras de 8 pocillos)

BG MWP (12 tiras de 8 pocillos)

Tampón de lavado

Cobas® 4800 HPV Test (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España)

El test Cobas 4800 HPV está diseñado para la detección y genotipado simultáneo del ADN del VPH mediante PCR a tiempo real en el equipo Cobas 4800 directamente a partir de la muestra primaria recogida en el vial de

Preservcyt. El test consiste en una PCR múltiple con 4 marcadores: el marcador 1 detecta un pool de 12 genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 y -68); los marcadores 2 y 3 detectan los tipos VPH-16 y VPH-18, respectivamente y el marcador 4 esta dirigido al gen de la β -globina humana y sirve como control de todo el proceso.

Los reactivos necesarios son:

AD-PLATE

LIQ CYT PREP KIT

EXTRACCION PLATE 1,6M

CORE TIPS HIGH VOLUME TIP

Cobas 4800 System Sample Preparation kit

MGP (partículas magnéticas)

EB (Buffer de elución)

Cobas 4800 System Liquid Cytology Preparation kit

PK (Proteinasa K)

SDS

LYS (Buffer de lisis)

Cobas 4800 System Wash Buffer kit

Cobas 4800 HPV Amplification/Detection kit

HPV MMX

HPV Mg/Mn

Cobas 4800 HPV Controls Kit

HPV (+) C

HPV (-) C

REAGENT RESERVOIR 50 ML

REAGENT RESERVOIR 200 ML

7.7. Genotipado del VPH

Linear Array® HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España).

El test utiliza unos cebadores biotinilados que definen una secuencia de nucleótidos de aproximadamente 450 pares de bases dentro de la región L1 del genoma del VPH. Se usa un pool de cebadores para detectar 37 genotipos de VPH tanto de alto riesgo como de bajo riesgo, incluyendo los mismos 13 tipos de genotipos de alto riesgo que son detectados por el test Amplicor. Adicionalmente hay una pareja de cebadores para amplificar el gen de la α -globina humana que se emplea como un control interno de la presencia de células humanas en la muestra, del proceso de extracción y del proceso de amplificación. El test se realizó a partir del ADN extraído con el kit TNAI en el equipo Cobas Ampliprep de aquellas muestras que habían salido Positivas (d.o >0.2) con el test Amplicor.

Reactivos de Amplificación

HPV Mg²⁺.

HPV MMX.

HPV (+) C. Control positivo

HPV (-) C. Control negativo

HPV Strip (Tiras de nitrocelulosa). 4 envases x 12 tiras

Reactivos de Detección

DN X2 (Solución de desnaturalización). 2 x 12 ml

SSPE. 2 x 160 ml

SDS. 4 x 27 ml

CIT. (Concentrado de citrato)

SA-HRP. (Conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano picante)

SUB-A. (Sustrato A)

SUB-B. (Sustrato B)

7.8. Material inventariable

Equipo Ampliprep (Roche Diagnóstico)

Equipos Cobas 4800 X y Cobas 4800 Z (Roche Diagnostic)

Equipo AUTOLIPA (Siemens Healthcare)

Termociclador GeneAmp PCR system 9700 con bloque de plata recubierto de oro de 96 pocillos (Applied Biosystem)

Lavador de microplacas (Wellwash 4 MK 2 Thermo)

Lector de Absorbancia (Multiskan EX)

Cabina de seguridad biológica de clase IIB3.

Teñidor de citologías LEICA AUTO-STAINER XL (CV5030)

Vortex

Pipetas y puntas con filtro para volúmenes de 5-40 μ l, 20-200 μ l y 200-1000 μ l.

Baño ajustable a 56 °C

Asa bacteriológica de siembra

Centrífuga

Estufa de 37°C

Tubos Falcon de 50 ml

Frascos estériles para recogida de orina

Reloj

Tubos eppendorf de 2 ml

Probeta de 1 L

Programas SPSS 18.0 y Excel para windows para realizar el estudio estadístico.

8. MÉTODOS

8.1. Toma de muestras cervicales para detección del VPH y estudio citológico

-Insertar las cerdas centrales del escobillón en el canal endocervical/anal con la profundidad suficiente para permitir que las cerdas más cortas entren en contacto con el endocervix/recto. Empujar con cuidado y girar el cepillo en sentido de las agujas del reloj 5 veces.

-Aclarar el cepillo en el vial de la solución PreservCyt empujando el cepillo hasta el fondo del vial 10 veces forzando la separación de las cerdas. Como paso final hacer girar con fuerza el cepillo para liberar aún más material. Desechar el dispositivo de recogida. No dejar la cabeza del cepillo en el vial.

-Apretar el tapón hasta que la línea de giro de la tapa sobrepase la línea de giro del vial.

-Poner etiqueta identificativa de paciente ó anotar el nombre del paciente y su número de identificación en el vial.

En el mismo examen pélvico se realizaron extensiones correspondientes a una triple toma, para hacer el diagnóstico citológico mediante la tinción de Papanicolau.

A criterio del ginecólogo se realizó el estudio colposcópico. En aquellos casos en los que se encontraron hallazgos colposcópicos patológicos se tomó una biopsia de tejido para estudio patológico.

8.2. Toma de Muestras de orina

En el mismo día que se iba a realizar la exploración pélvica a la mujer, se les solicitó que recogieran una muestra de la primera orina de la mañana en un frasco estéril. Se les pidió que recogieran la primera parte de la micción y además que fuera antes de lavarse la zona genital.

8.3. Cultivo de orina

A su recepción, se sembraron 10 μ l de las orinas recibidas en una placa de medio de agar sangre (bioMerieux España) que fue incubado a 37°C durante 48 horas. Se registró el número de unidades formadoras de colonias por mililitro cultivadas(ufc/ml), aunque no se procedió a la identificación de los diferentes tipos de colonia crecidos.

8.4. Estudio Citológico

La técnica implica el uso de tres soluciones diferentes, por un lado la correspondiente a la hematoxilina, por otro la que contiene Orange G (solución de Papanicolaou OG) y la última con el resto de colorantes (solución de Papanicolaou EA).

El procedimiento de tinción es el siguiente:

1. Fijar la muestra con spray.
2. Sumergir en alcohol 96%, varios lavados.
3. Teñir con Hematoxilina de Harris solución durante 5 minutos aproximadamente.
4. Sumergir en agua corriente 10 min.

5. Sumergir en Ácido Clorhídrico 0,10%, 3 veces.
6. Lavar con agua corriente durante 5 minutos, y pasar la muestra por alcohol al 100% durante 10 segundos, dos veces.
7. Teñir con Solución de Papanicolaou OG 6, 1 minuto.
8. Lavar el exceso de colorante en dos baños de Etanol 100% sumergiendo la preparación 2 veces en cada uno de 3 a 4 segundos.
9. Teñir con Solución de Papanicolaou EA 50, 1,5 minutos.
10. Lavar en 3 recipientes distintos de Etanol 100%, sumergiendo la preparación 2 veces de 3 a 4 segundos en cada uno de ellos.
11. Aclarar con Xileno, sumergiendo la preparación durante 3 minutos en un baño.

Una vez terminado el proceso de tinción, hay que dejar secar al aire las preparaciones.

Cuando ya estén completamente secas, es necesario pasar al proceso de montaje, que es la unión entre el portaobjetos y la laminilla cubreobjetos utilizando resina sintética, con el fin de obtener una muestra cubierta y protegida contra la oxidación del material celular. El montaje se realiza aplicando una pequeña cantidad de resina que cubra completamente el extendido del portaobjetos, para colocar posteriormente el cubreobjetos, teniendo la precaución de evitar la formación de burbujas. Este procedimiento permite la formación de una película transparente que facilita una adecuada visualización celular.

Todo el proceso se ha automatizado en un teñidor automático que tiñe y monta las preparaciones, y que fue utilizado en los extendidos valorados en este estudio.

La valoración de los extendidos citológicos se realizó siguiendo el método de Bethesda 2002 (49):

A.- Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

B.- Anomalías celulares epiteliales en células escamosas

- Células escamosas atípicas (ASC)
 - de significado indeterminado (ASC-US)
 - no puede excluirse H-SIL (ASC-H)
- Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (L-SIL), comprendiendo:
 - displasia leve/CIN 1
 - HPV
- Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (H-SIL), comprendiendo:
 - displasia moderada, severa y CIN/CIN 2 y 3
 - con características sugestivas de invasión (si se sospecha invasión)
- Carcinoma epidermoide

C - Anomalías celulares epiteliales en células glandulares

- Células glandulares atípicas (AGC)

- endocervicales
- endometriales
- glandulares
- Células atípicas, sugestivas de neoplasia
- endocervicales
- glandulares
- Adenocarcinoma endocervical in situ (AIS)
- Adenocarcinoma
- endocervical
- endometrial
- extrauterino
- no específico (NOS).

8.5. Extracción del ADN del VPH para los test AMPLICOR Human Papilloma Virus y Linear Array

1) Reconstituir el RNA carrier del kit AmpliLute con 310 µL del buffer AVE del mismo kit.

2) Preparar la solución IC/QS justa para las extracciones que se vayan a realizar:

12 extracciones: 1075 µL diluyente IC/QS + 75 µL RNA carrier reconstituido

24 extracciones: 2000 µL diluyente IC/QS + 150 µL RNA carrier reconstituido

48 extracciones: 4000 µL diluyente IC/QS + 300 µL RNA carrier reconstituido

Almacenar el RNA carrier reconstituido que no se use a -20°C.

3) Colocar la solución IC/QS preparada en el paso anterior en la posición C del cassette 3 (CS3) del Ampliprep.

4) Descartar todo el buffer de elución (EB) de la posición A del cassette 3 (CS3) y rellenar la misma botella con el contenido de los cuatro viales de buffer AVE del kit AmpliLute.

5) Colocar todos los cassettes del equipo TNAI en el Cobas AmpliPrep evitando el deterioro de los códigos de barras de los mismos.

6) Pipetear 850 µL de cada una de las muestras, previamente agitadas, en tubos de entrada de Cobas AmpliPrep.

7) Pipetear 850 µL de control positivo y control negativo HPV, previamente agitados, en tubos de entrada de Cobas AmpliPrep.

8) Pipetear 200 µL de buffer ATL en cada uno de los tubos de Cobas AmpliPrep con muestras o controles.

9) Incubar durante 30 minutos a 56 °C

Terminada la incubación, colocar los tubos en el rack de muestras de Cobas AmpliPrep y proceder según las instrucciones del instrumento.

8.6. Amplificación y detección del ADN del VPH con el AMPLICOR Human Papilloma Virus a partir de muestras cervicales

Preparación de los reactivos de Amplificación

1) Preparar la Working Master Mix añadiendo 150 µL de HPV Mg²⁺ a un vial de HPV MMX. Mezclar bien invirtiendo el tubo 10 - 15 veces. NO agitar en vortex.

- 2) Situar el ensamblaje MicroAmp sobre un soporte de bandejas de amplificación.
- 3) Añadir 50 μ L de Working Master Mix en cada uno de los tubos de amplificación colocados en la bandeja de amplificación.
- 4) Colocar la bandeja de tubos con MMX y el apropiado número de tapas de tubos en una bolsa de plástico precintable. Almacenar a 2- 8 °C
- 5) La amplificación debe de comenzar antes de que pasen 4 horas.

Procedimiento de Amplificación

- Añadir 50 μ L del extraído en un tubo de amplificación conteniendo la working Master Mix.
- Colocar la gradilla con los tubos de amplificación que contienen la Working Master Mix y las muestras/controles en un termociclador GeneAmp PCR System 9700.
- Programar el termociclador según el cuadro siguiente:

Programa	Descripción	Nº de ciclos
HOLD	50°C; 2 minutos	1
HOLD	95°C; 9 minutos	1
	95°C; 30 segundos	
Ciclos	54°C; 45 segundos	40
	72°C; 30 segundos	
HOLD	72°C; indefinidamente	

Seleccionar el método y presionar START. Comprobar que las opciones Ramp Speed y Reaction Volume se encuentran programadas como "MAX" y "100µL" respectivamente.

Pulsar START nuevamente. El proceso durará aproximadamente, 2 horas y 45 minutos.

- Sacar la bandeja de tubos de amplificación del termociclador dentro de la hora siguiente de la finalización del último ciclo, durante el hold final de 72°C, y colocarla sobre un soporte de bandejas de amplificación.
- Quitar las tapas de los tubos y añadir 100 µL de Denaturation Solution a cada uno de los tubos. Mezclar, por aspiración con la misma punta de pipeta, 4-5 veces. Cerrar los tubos una vez añadida y mezclada la Denaturation Solution.

Las muestras amplificadas y desnaturalizadas deben de detectarse antes de que pasen dos horas, o bien pueden almacenarse a 2 – 8 °C durante el plazo de una semana.

Procedimiento de Detección

Determinar el número de pocillos de AMPLICOR HPV y de AMPLICOR β-globina, así como la cantidad de los distintos reactivos necesarios para la detección de los amplicones generados.

Los amplicones de cada reacción de amplificación han de detectarse, tanto en los pocillos de AMPLICOR HPV (HPV MWP), como en los de AMPLICOR β -globin (BG MWP).

- Añadir 100 μ L de Hybridization Solution en cada uno de los pocillos de las microplacas por detectar.
- Añadir 25 μ L de amplicón desnaturalizado desde los tubos de amplificación a sus correspondientes pocillos de las microplacas. Mezclar, por aspiración con la misma punta de pipeta, 4-5 veces.
- Los siguientes pasos son idénticos, tanto para la microplaca HPV MWP, como para la β -globin MWP:
- Tapar la MWP e incubar durante una hora a 37°C.
- Preparar la Working Wash Solution añadiendo 1 volumen de 10X Wash Concentrate a 9 volúmenes de agua destilada o desionizada. La Working Wash Solution es estable a temperatura ambiente durante dos semanas.
- Finalizada la hora de incubación, lavar la microplaca 5 veces en un lavador automático de microplacas.

Programación automática del lavador

- Aspirar el contenido de los pocillos.
- Llenar cada pocillo con Working Wash Solution (250-300 μ L dependiendo del lavador). Dejar 30 segundos y aspirar bien todo el líquido.

- Repetir el Paso anterior 4 veces más.
- Secar bien la placa golpeándola con suavidad sobre papel secante.
- Añadir 100 μ L de Avidin-HRP Conjugate en cada pocillo de la microplaca
- Cubrir la microplaca e incubar durante 15 minutos a 37°C.
- Preparar la Working Substrate mezclando, para cada 16 pocillos (8 de HPV y 8 de β -globin), 2.0 mL de Substrato A y 0.5 mL de Substrato B en un recipiente adecuado. Proteger la Working Substrate de la luz.
- Lavar la MWP cinco veces con Working Wash Solution.
- Añadir 100 μ L de Working Substrate en cada pocillo de la microplaca.
- Dejar desarrollar el color durante 10 minutos y en la obscuridad.
- Añadir 100 μ L de Stop Solution en cada pocillo de la microplaca
- Realizar la lectura de la microplaca durante los primeros 10 minutos después de haber añadido la Stop Solution. Usar un lector de microplacas y medir la Densidad Óptica (OD) a 450nm (A450).

Interpretación de los Resultados

Los criterios de validación de una serie son:

- Los valores de A_{450} de los controles AMPLICOR HPV(-) Control HPV y BG deben de ser inferiores a 0.20.
- Los valores de A_{450} de los controles AMPLICOR HPV(+) Control HPV y BG deben de ser iguales o superiores a 1.0

- Interpretación de los resultados:

HPV A ₄₅₀	β -globin A ₄₅₀	Interpretación
< 0.20	> 0.20	No se detecta ADN de VPH de alto riesgo
< 0.20	< 0.20	Resultado inválido. Procesar otra alícuota de la muestra original y repetir el proceso completo.
> 0.20	Cualquiera	Detección Positiva de ADN de VPH de alto riesgo

8.7. Genotipado del VPH con el test Linear Array

Preparación de los reactivos de Amplificación

- Preparar la Working Master Mix añadiendo 125 μ L de HPV Mg²⁺ a un vial de HPV MMX. Mezclar bien invirtiendo el tubo 10-15 veces. NO agitar en vortex. Un vial de Working Master Mix es suficiente para 12 amplificaciones. La solución de Working Master Mix es estable durante cuatro horas a 2-8°C.
- Añadir 50 μ L de Working Master Mix en cada uno de los tubos eppendorf de amplificación (pequeños) rotulados y colocados en una bandeja de amplificación. Chequear visualmente que la Working Master Mix ha sido añadida a todos los tubos de amplificación.
- Pipetear 25 μ l de las muestras y controles extraídos en sus correspondientes tubos de amplificación que ya contienen la Working Master Mix.

- Llevar al termociclador (comprobar que el volumen de reacción son 75 μ l) y lanzar el programa de genotipado. El proceso durará aproximadamente 3 horas y 15 minutos.

El programa de genotipado del termociclador es el siguiente:

Programa	Descripción	Nº de ciclos
HOLD	50°C; 2 minutos	1
HOLD	95°C; 9 minutos	1
	95°C; 30 segundos	
Ciclos	55°C; 60 segundos	40
	72°C; 60 segundos	
HOLD	72°C; 5 minutos	1
HOLD	72°C; indefinidamente	

- El proceso dura aproximadamente 3 horas y 15 minutos. Al finalizar el programa, la muestra se mantiene indefinidamente a 72 °C. Hay que sacar los tubos con el amplificado del termociclador dentro de la hora siguiente de la finalización del último ciclo, durante el hold final de 72 °C
- Pipetear 100 μ l de la solución desnaturalizante (DN) a cada uno de los tubos. Mezclar por aspiración con la misma punta de pipeta 4-5 veces. Las muestras amplificadas y desnaturalizadas deben detectarse antes que pasen 2 horas, o bien pueden almacenarse a 2-8 °C durante el plazo de una semana.

Procedimiento de Detección

Se hace de forma semiautomatizada con el equipo AUTOLIPA pero antes hay que preparar los reactivos/soluciones de trabajo necesarios. Hay que asegurarse de que los reactivos SSPE, SDS y CIT no presenten precipitados. Calentarlos a 53 +/- 2°C si fuese necesario.

Solución de hibridación: en un recipiente apropiado añadir 388 ml de agua destilada y 100 ml de SSPE. Mezclar bien y seguidamente añadir 12.5 ml de SDS. Volver a mezclar. Este reactivo es fundamental que esté a una temperatura aproximada de 53 °c por lo que antes de emplearlo calentarlo a dicha temperatura y mantenerlo en un bloque térmico hasta su uso.

Solución de lavado ambiente: 2.520 ml de agua destilada + 133 ml de SSPE. Mezclar bien y, seguidamente añadir 13.3 ml de SDS. Volver a mezclar.

Solución de Citrato: Mezclar 475 ml de agua destilada y 25 ml de CIT.

Las tres soluciones de trabajo se mantienen estables durante un mes a temperatura ambiente.

Hay otras dos soluciones que son necesarias pero hay que prepararlas inmediatamente antes de su uso:

Solución Conjugada: Por cada tira a analizar añadir a un recipiente adecuado 5 ml de solución de lavado ambiente y 15 µl de SA-HRP. Mezclar bien. Esta solución es estable 3 horas a temperatura ambiente.

Solución de sustrato: Por cada tira a analizar añadir a un recipiente adecuado 4 ml de SUB A y 1 ml de SUB B. Mezclar bien. Esta solución es estable 3 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Procedimiento

Mantenimiento diario del AUTOLIPA

- Poner cada una de las bombas en un recipiente con cantidad suficiente de agua destilada
- Encender el equipo (Boton ON/OFF por detrás)
- Seleccionar con la teclas < > la opción Liquid prep. Pulsar YES
- Seleccionar con la teclas < > la opción Auto Clean. Pulsar YES
- Aparecerá CLEAN LIQUID?. Pulsar YES. El lavado de todas las bombas se realiza entonces de forma automática. Después aparecerá DESTILLED WATER?. Pulsar YES
- Al final aparecerá Tub cleaning ¡. Pulsar cualquier tecla. Aparecerá REMOVE WATER. Pulsar YES

El AUTO-LIPA queda listo para su utilización.

Lanzamiento del programa del genotipado

- RUN Program <> YES

- Waste bottle OK? Comprobar que la botella de desecho está vacía y los tubos de desecho se han colocado correctamente. Pulsar YES
- Aparecerá Check Sieves \bar{ij} . Comprobar que los filtros en las botellas de agua destilada del circuito cerrado de agua están bien colocados y no están obstruidos. Pulsar la tecla Intro
- Seleccionar con los botones +/- el programa de genotipado. Pulsar YES
- Aparecerá Temp. 56 °C. Pulsar YES. Aparecerá Preparing in progress. Esperar que el AUTO-LIPA alcance la temperatura de trabajo.

Durante este periodo se aprovecha para ir preparando y poniendo en envases apropiados las distintas soluciones de trabajo. Las distintas soluciones se situarán de la siguiente forma:

BOMBA 1: Solución de hibridación

BOMBA 2: Agua destilada

BOMBA 3: Solución de lavado ambiente

BOMBA 4: Solución conjugada de trabajo

BOMBA 5: Solución de citrato

BOMBA 6: Solución de sustrato

Aparecerá INSERT TRAY. Colocar la bandeja con el número de tiras que se vayan a hacer. Pulsar una tecla

Aparecerá StPos Strip: 01. Pulsar YES

Aprecerá Nr of Strip: Teclear el numero de tiras que se va a procesar. Pulsar YES

Aparecerá Last aspiration?. Pulsar YES

Aparecerá Proc. 1 Inc. Pulsar YES.

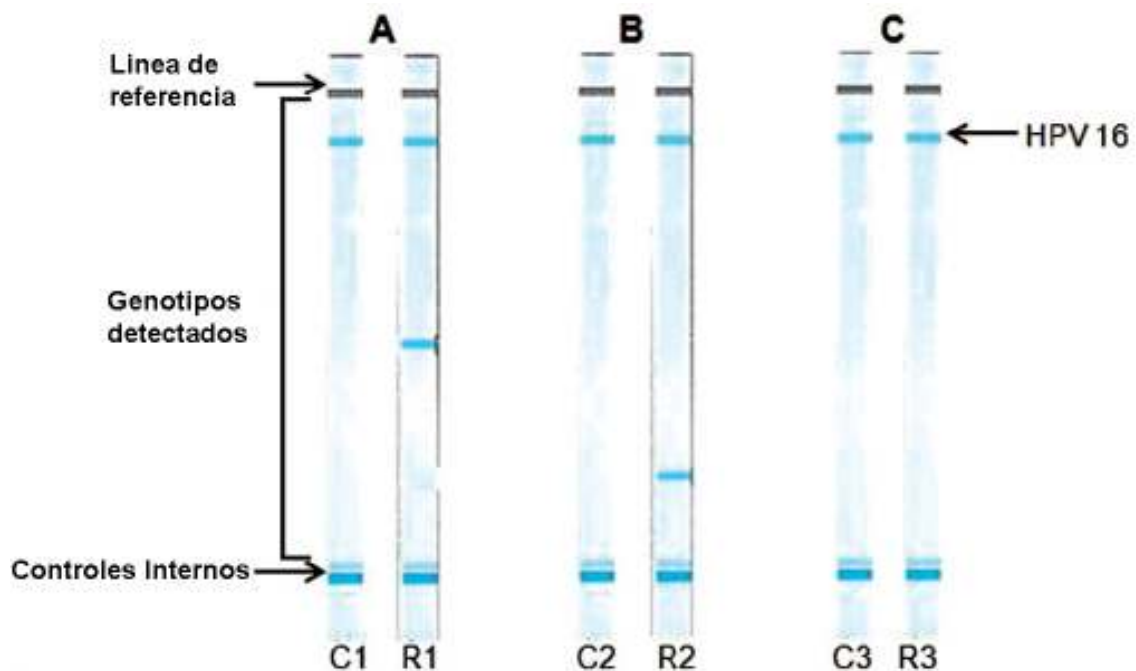
Tras una incubación de 2 minutos, la máquina se quedará en pausa. Es en este momento cuando se añaden 10 ul de la muestra amplificada en su correspondiente tira.

Pulsar Cont.

Interpretación de los Resultados

Verificar que los resultados de los controles de la serie analítica son válidos. Si la serie analítica no es válida, se repetirá por completo (preparación de las muestras, amplificación y detección Linear Array).

Se extraen las tiras de la bandeja y se colocan sobre una superficie no porosa limpia (por ej., papel de filtro) y se alinea la guía de referencia de la prueba de genotipado del VPH Linear array con la línea de referencia (REF) marcada con tinta en la parte superior de la tira. Anotar las bandas positivas visibles e interpretar los resultados de VPH y de β -globina (BG) de cada tira de la siguiente forma:

Fig 8: Revelado del genotipado específico con el Linear array

8.8. Detección del ADN del VPH con el test Cobas 4800 HPV a partir de muestras cervicales

- Agitar las muestras con el vortex y quitarles el tapón.
- Atemperar los reactivos (son 10 reactivos diferentes y de un solo uso)
- Encender el analizador Cobas z, la unidad HEATHER/SHAKER y el instrumento Cobas x 4800 en el orden indicado.
- Entrar en el programa Cobas 4800 (User ID/Password)
- En la pestaña Cobas x 480 comprobar el estado de mantenimiento diario o semanal del equipo. Realizar solo el semanal cuando se requieran ambos.
- Seleccionar el icono "New Run". Seleccionar el tipo de test "HPV Workflow"
- Nombrar la serie en el campo "Run name": VPH añomesdia

- Colocar las muestras en sus bandeja correspondientes de 12 posiciones. Asegurarse que los códigos de barras están situados correctamente para poder ser leídos por el instrumento.
- Colocar las bandejas en cualquiera de los carriles con luz verde encendida. Los códigos de barras de las bandejas deben ir delante y a la derecha.
- Load samples
- Colocar una placa de extracción (transparente), una placa de reacción (blanca) y 10 bandejas de puntas en sus transportadores apropiados. Los códigos de barras de las bandejas deben ir delante y a la derecha.
- Colocar los transportadores en sus posiciones correspondientes:
 - Transportador de placas: posiciones 1 a 6
 - Transportador de puntas izquierdo: Posiciones 11 a 16
 - Transportador de puntas derecho: Posiciones 35 a 40
- Carga de reactivos. Seguir las instrucciones que vienen en pantalla.
- Colocar los transportadores en la posición donde se encienda la luz verde.
- Las partículas magnéticas MGP hay que vortearlas 10 segundos enérgicamente (hasta que la base esté transparente).
- Los controles, la PK, MN/MG y MMX hay que darles un pulso de centrífuga.
- Después de cada carga de grupos de reactivos Pulsar “Load Reagents”
- Una vez cargados todos los reactivos pulsar “Start Run”.
- La extracción dura 90 minutos aproximadamente
- Pulsar “Unload” para sacar todos los transportadores

- Sellar la placa de amplificación tal y como se indica en la pantalla
- Pulsar “Next” en el programa Cobas 4800
- Pulsar el botón de carga del Cobas z 480 y colocar la placa en el cargador
- Pulsar nuevamente el botón de carga del Cobas z 480 para cerrar el cargador. La amplificación de detección comienza automáticamente.
- Transcurridas unas 2 horas el proceso finaliza .
- Pulsar en “Show results”. En el menú resultados buscar la serie apropiada para visualizar los resultados.

8.9. Detección del ADN del VPH con el test Cobas 4800 HPV a partir de muestras de orina

Preparación de la muestra de orina

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 10000 r.p.m durante 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en aproximadamente 5 ml del sobrenadante e inmediatamente fue vertido en un vial de Preservcyt Solution vial. Cuando el volumen de orina recibido fue <20 ml, se vertió directamente en el vial de preservcyt sin centrifugar. Los viales de Preservcyt conteniendo las muestras de orina (tanto centrifugada como no centrifugada) fueron guardadas en nevera un máximo de 5 días hasta su procesamiento.

Para el procesamiento de las muestras de orina así preparadas con el equipo Cobas 4800, se siguió el mismo protocolo que en el caso de muestras cervicales.

8.10. Estudio Estadístico

Para la primera comparativa, dado que el test Cobas 4800 HPV detecta todos los genotipos de alto riesgo diferentes a los tipos 16 y 18 como conjunto no es posible asegurar el número de tipos presentes en la muestra. Por ello, los resultados fueron arbitrariamente categorizados como sigue: “1” si la combinación Amplicor/Linear Array ó el resultado del Cobas 4800 HPV fueron negativos; “2” si se detectaron los genotipos 16 y/o 18 (independientemente de que se detectaron otros genotipos de alto riesgo); “3” si solo se detectaron genotipos de alto riesgo; “4” Si el Amplicor fue positivo y el Linear Array fue negativo. La concordancia entre ambos test determinó utilizando tablas de contingencia y se calculó el índice kappa de Cohen (k) con intervalos de confianza del 95% (95% IC) definiéndose como “mala” ($0 < k < 0,39$), “moderada” ($0,40 < k < 0,69$), “buena” ($0,70 < k < 0,79$), “muy buena” ($0,80 < k < 1$) y “perfecta” ($k=1$).

Para el análisis estadístico del estudio comparativo de la detección del ADN VPH en muestras pareadas de cervix/orinas se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la detección del ADN del VPH en muestras de orina empleando como “gold standard” la detección en muestras cervicales con intervalos de confianza del 95% (95% IC). También analizamos la concordancia entre ambas determinaciones mediante el calculo del índice Kappa de Cohen. Para el cálculo de diferencias entre proporciones pareadas se usó el test de McNemar.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de $P < 0,05$.

El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS 18.0 y excell para Windows.

9. RESULTADOS

9.1. Comparación del Cobas 4800 HPV como test único frente a la combinación del los test Amplicor Human Papilloma virus y Linear Array para la detección de los tipos de VPH de alto riesgo en conjunto y genotipado simultaneo de los tipos VPH-16 y VPH-18 en muestras cervicales

Para esta primera comparación, estudiamos muestras de exudados cervicales de 340 mujeres que acudían a la consulta de diagnóstico precoz de cáncer de cérvix del hospital de valme. La edad media fue de 35 años (rango 21-65 años).

Se dispuso del resultado de la citología cervical en 308 mujeres de las cuales 176 eran citologías no patológicas y 70 eran patológicas (24 HSIL y 46 LSIL). 62 citologías fueron informadas como ASCUS. Los resultados de la citología se informaron de acuerdo con los criterios de Bethesda (49)

En primer lugar analizamos la detección cualitativa de la infección por el VPH de alto riesgo (presencia ó ausencia del virus) del Cobas Amplicor comparándolo con el test HPV Cobas 4800 sin tener en cuenta los genotipos específicos detectados. La prevalencia de infección por el VPH fue del 41,7% con el Amplicor y del 42,3% con el test COBAS HPV 4800. Los resultados de la comparación están recogidos en la tabla 1. El porcentaje de correlación para ambos test fue del 92.2% y la concordancia casi perfecta ($\kappa = 0.87$, IC 95%: 08-091).

Tabla 1 Concordancia en la detección del VPH entre el Cobas Amplicor y el test Cobas HPV 4800

		Test 4800 HPV	
		Positivo	Negativo
Test Amplicor	Positivo	131	11
	Negativo	13	185
Correlación		92,2%	
Kappa (IC 95%)		0,87 (0,8-0,91)	

Hubo 24 discordancias entre ambos test. En ninguna de las discrepancias se detectaron lesiones de alto grado en la citología (Tabla 2). Un total de 11 muestras fueron Amplicor positivo y Cobas 4800 negativas. De ellas, en 6 muestras no se detectó ningún genotipo con el Linear Array. Por el contrario, el Cobas 4800 detectó 13 muestras que no fueron detectadas con el Amplicor. En 11 de ellas, se detectaron únicamente genotipos de alto riesgo (AR) y en 2, se detectó el genotipo 16.

Tabla 2. Genotipado individual con Linear Array en las muestras con discrepancia entre el Amplicor y el test Cobas 4800 HPV

Citología	Cobas Amplicor	Linear Array	test 4800 HPV	Genotipo
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
LSIL	Positivo	16	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR+16+18	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
Negativa	Negativo	-	Positivo	16
Negativa	Negativo	-	Positivo	AR+16
Negativa	Negativo	-	Positivo	AR
Negativa	Negativo	-	Positivo	AR
Negativa	Negativo	-	Positivo	AR
Negativa	Negativo	-	Positivo	AR
ASCUS	Negativo	-	Positivo	AR
ASCUS	Negativo	-	Positivo	AR
ASCUS	Negativo	-	Positivo	AR
LSIL	Negativo	-	Positivo	AR
LSIL	Negativo	-	Positivo	AR
LSIL	Negativo	-	Positivo	AR
LSIL	Negativo	-	Positivo	AR

AR: VPH de alto riesgo oncogénico excluidos el VPH-16 y VPH-18. LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance

En el plan de trabajo solo se contempló que únicamente las muestras que fueran positivas con el test Amplicor fueran procesadas con el Linear Array (un total de 142 muestras). El Linear Array fue positivo en 132 de ellas (92,9%), pero en 10, no se detectó ningún genotipo. De esas 10 muestras Amplicor+/Linear Array -, 6 muestras fueron a su vez negativas con el test Cobas HPV 4800 y 4 fueron positivas para VPH de alto riesgo (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del test Cobas 4800 HPV en muestras Cobas Amplicor positivas/ Linear Array negativas

Citología	test 4800 HPV	Genotipo detectado
Negativa	Negativo	-
Negativa	Negativo	-
Negativa	Negativo	-
Negativa	Negativo	-
Negativa	Negativo	-
Negativa	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR
ASCUS	Positivo	AR
ASCUS	Positivo	AR
ASCUS	Positivo	AR

AR: VPH de alto riesgo oncológico excluidos el VPH-16 y VPH-18

En total, el genotipado entre el Cobas 4800 y el Linear Array fue coincidente en 119 muestras de las 142 analizadas (83,8%), habiendo por tanto 23 discrepancias entre ambos (Tabla 4). Cinco fueron muestras positivas para Linear Array y negativas por el test Cobas HPV 4800, otras 4 fueron Linear Array negativas y positivas con el 4800 y 14 muestras fueron positivas por ambos métodos pero con distintos genotipos detectados. El genotipo VPH16

fue detectado en 71 muestras con el Linear Array. En 66 de ellas, dicho genotipo también fue detectado con el Cobas 4800 HPV test. De las 5 restantes, el Cobas 4800 detectó únicamente VPH de AR en 3 muestras y en las otras 2 fue negativo. Por el contrario, el Cobas 4800 detectó el VPH 16 en 3 muestras que no detectó el Linear Array. Con respecto al tipo VPH 18, fue detectado por ambas técnicas en 17 muestras. Hubo 2 muestras que fueron positivas con el Linear Array pero negativas con el Cobas 4800. Por el contrario el Cobas 4800 detectó la presencia del VPH 18 en 2 muestras que no fueron detectadas con el Linear Array. (Tabla 4).

Tabla 4. Discrepancias en el genotipado entre Linear Array y el test Cobas 4800 HPV

Citología	Cobas Amplicor	Linear Array	4800 HPV	Genotipo detectado
ASCUS	Positivo	16+18	Positivo	16
ASCUS	Positivo	Negativo	Positivo	AR
ASCUS	Positivo	Negativo	Positivo	AR
ASCUS	Positivo	Negativo	Positivo	AR
HSIL	Positivo	16	Positivo	AR+16
HSIL	Positivo	16	Positivo	AR+16
HSIL	Positivo	AR	Positivo	AR+16
LSIL	Positivo	16	Positivo	AR+16
LSIL	Positivo	16	Negativo	-
Negativa	Positivo	16	Positivo	AR+16
Negativa	Positivo	16	Positivo	AR+16
Negativa	Positivo	AR	Positivo	AR+16
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR	Positivo	AR+16
Negativa	Positivo	AR	Negativo	-
Negativa	Positivo	AR+16	Positivo	AR
Negativa	Positivo	AR+16	Positivo	AR+16+18
Negativa	Positivo	AR+16	Positivo	AR
Negativa	Positivo	AR+16	Positivo	AR+16+18
Negativa	Positivo	AR+16	Positivo	AR
Negativa	Positivo	AR+16+18	Negativo	-
Negativa	Positivo	Negativo	Positivo	AR

HSIL: High Grade squamous intraepithelial lesion. LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos con la combinación de la técnica del Amplicor seguida del Linear Array (detección más genotipado específico), frente a los obtenidos con la prueba del test Cobas HPV 4800, obtuvimos un porcentaje de correlación del 92,7% y una concordancia muy buena ($K= 0,87$, IC 95%: 0,82-0,92) (Tabla 5). Si consideramos únicamente el genotipo VPH-16 la correlación fue del 94,3% y un índice kappa de 0,93 (IC 95%: 0,87-0,99). Para el genotipo VPH- 18 dichos valores fueron del 97% y 0,88 (IC 95%: 0,76-1) respectivamente. En 13 muestras el test Cobas HPV 4800 detectó VPH de AR que no fue detectado con la combinación Amplicor/Linear Array y en 3 muestras detectó VPH 16 y/o 18 que no fue tampoco detectado con dicha combinación. Por el contrario, la combinación Amplicor/Linear Array detectó 8 muestras positivas (2.3%) que no fueron detectadas con el Cobas 4800 (en 5 casos el test Cobas HPV 4800 fue negativo, y en 3 no detectó los VPH de los tipos 16 y/o 18).

Tabla 5. Tabla de contingencias de la comparación entre el test Cobas HPV 4800 y la combinación Cobas Amplicor y Linear Array

	Cobas 4800 HPV test			
	Negativo	HPV 16 y/o 18	HPV AR	TOTAL
Amplicor/Linear Array Negativos	185 (56.1%)	3 (0.9%)	10 (3%)	198 (60%)
Amplicor +/Linear Array+ (solo VPH 16 y/o 18)	2 (0.6%)	74 (22.4%)	3 (0,9%)	79 (23.9%)
Amplicor +/Linear Array+ (solo VPH AR)	3 (0.9%)	3 (0.9%)	47 (14.2%)	53 (16.1%)
Total	190 (57.6%)	80 (24.2%)	60 (18.2%)	330 (100%)
Concordancia	92.7%			
Indice kappa	0.872 (IC 95%:0,82-0,92)			

La concordancia entre ambas metodologías fue muy alta, independientemente de los resultados del estudio citológico de las mujeres (tabla 6). Todas las mujeres diagnosticadas de HSIL (24 mujeres) fueron detectadas como positivas para VPH por ambos métodos, aunque hubo 3 discrepancias con respecto al genotipado específico (Tabla 4) y solo una de ellas fue debido a la no detección por el Linear Array de un tipo VPH-16. La mayoría de las discrepancias mayores (es decir, positivas por algún método, pero negativas por otro) tuvieron lugar en mujeres con citología negativa o con lesión de bajo grado (LSIL) (Tablas 2 y 4). En aquellas muestras negativas para el test Cobas HPV 4800

Tabla 6. Porcentaje de concordancia entre los resultados obtenidos con el test 4800 HPV y la combinación del Cobas Amplicor y Linear Array en relación con los resultados de la citología

Citología	Concordancia global (%)	Concordancia en positivos (%)	índice Kappa
Negativa (n=176)	96.8	74	0,803
ASCUS (n=62)	94.9	87.5	0,893
HSIL (n=24)	95.8	94.1	0,903
LSIL (n=46)	89.1	82.3	0,760

HSIL: High Grade squamous intraepithelial lesion. LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance

9.2. Comparación en la detección de ADN del VPH en muestras pareadas de cérvix y orina con el test Cobas HPV 4800

El estudio se realizó sobre 145 muestras pareadas de cérvix y orina de mujeres derivadas de atención primaria a la consulta de diagnóstico precoz del cáncer de cérvix del Hospital Universitario de Valme por resultados anómalos de una citología. El 100% de las muestras analizadas tuvieron un resultado válido, es decir, en aquellas muestras con resultado negativo, el gen de la B-globina (empleado como control interno) fue detectado. La prevalencia de infección por el VPH fue del 51,7% (75/145) en muestras cervicales y del 51% (74/145) en las muestras de orina. En 122 casos el resultado fue coincidente en ambos tipos de muestras, con una correlación del 84.15% y una concordancia sustancial ($k = 0.68$, 95% IC 0.56-0,80) (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia para el total de muestras pareadas cérvix/orina

		Todas las muestras (n=145)		Kappa (IC 95%)
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva ^a	63	12	0,68 (0,56-080)
	Negativa ^b	11	59	
Correlación		84,15%		

a: Detección del VPH positiva. b : Detección del VPH negativa

Influencia de la centrifugación de la orina

Todas las orinas recibidas con un volumen mayor de 20 ml fueron centrifugadas. El porcentaje de correlación osciló entre el 60% para muestras no centrifugadas (volumen mayor de 20 ml) y el 88% para muestras

centrifugadas (volumen mayor de 20 ml). Dentro de este último grupo de muestras no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre diferentes volúmenes procesados (Tabla 8). La concordancia pasó de mala ($k=0.23$, 95% IC 0-0,6) en las orinas no centrifugadas, a sustancial ($k=0.76$, 95% IC 0,64-0,87) en las orinas centrifugadas.

Tabla 8. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el volumen de orina procesado

		Muestras centrifugadas (<20 ml) (n=20)		Kappa (IC 95%)
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva ^a	6	6	0,23 (0-0,60)
	Negativa ^b	2	6	
Correlación		60%		
		Muestras no centrifugadas (>20 ml) (n=125)		
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	57	6	0,76 (0,64-0,87)
	Negativa	9	53	
Correlación		88,00%		
		Volumen procesado = 20-30 ml (n=32)		
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	14	1	0,75 (0,52-0,97)
	Negativa	3	14	
Correlación		87,50%		
		volumen procesado = 30-40 ml (n=35)		
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	17	2	0,77 (0,55-0,98)
	Negativa	2	14	
Correlación		88.5%		
		volumen procesado = 40-50 ml (n=58)		
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	26	3	0,75 (0,59-0,92)
	Negativa	4	25	
Correlación		87,90%		

a: Detección del VPH positiva. b : Detección del VPH negativa

Influencia de las características microbiológicas de la orina

Todas las muestras de orina fueron sembradas en un medio de agar sangre para realizar el recuento de ufc/ml como una medida indirecta de la contaminación de la orina con células epiteliales capaces de albergar el VPH. Los resultados de correlación y concordancia fueron ligeramente superiores en las orinas con mayor de 10^5 ufc/ml (84,2% y $k= 0,67$ respectivamente) respecto a las orinas con un recuento inferior a 10^5 ufc/ml (83,9%, y $k= 0,61$) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P>0.05$) (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el número de ufc^a/ml de la orina

		>10 ⁵ ufc/ml (n=89)		Kappa (IC 95%)
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	44	7	0,67 (0,52-0,83)
	Negativa	7	31	
Correlación		84,20%		

		<10 ⁵ ufc/ml (n=56)		Kappa (IC 95%)
		ORINA		
		Positiva	Negativa	
CÉRVIX	Positiva	19	4	0,61 (0,4-0,81)
	Negativa	7	28	
Correlación		83,90%		

ufc/ml: unidades formadoras de colonias por ml de orina

Influencia de la centrifugación y recuento bacteriano considerados simultáneamente

En la Tabla 10 se refleja el análisis realizado teniendo en cuenta ambos parámetros a la vez (centrifugación y recuento bacteriano) para todas las combinaciones posibles. La concordancia fue muy buena ($k=0,80$ IC 95% 0,62-

0,98) para aquellas muestras de orina procesadas tras centrifugación y que además tenían un recuento bacteriano bajo en el agar sangre (43 muestras). En este caso encontramos un único falso negativo de la orina (es decir positivo en la muestra cervical correspondiente) en una mujer en la cual tanto el resultado de la citología como de la biopsia fueron negativos. Los peores resultados de concordancia los encontramos en muestras no centrifugadas (20 muestras) con una correlación entre 61,5% y 57,1% para muestras con un bajo y un alto recuento bacteriano respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de correlación e índice kappa de concordancia según el volumen y nº de ufc/ml de la orina

Muestras con $<10^5$ ufc/ml/centrifugadas (n=43)			Kappa (IC 95%)
		ORINA	
		Positiva	Negativa
CÉRVIX	Positiva	15	1
	Negativa	3	24
Correlación		90,70%	
Muestras con $>10^5$ ufc/ml/centrifugadas (n=82)			
		ORINA	
		Positiva	Negativa
CÉRVIX	Positiva	42	5
	Negativa	6	29
Correlación		84,50%	
Muestras con $<10^5$ ufc/ml/no centrifugadas (n=13)			
		ORINA	
		Positiva	Negativa
CÉRVIX	Positiva	4	1
	Negativa	4	4
Correlación		61,50%	
Muestras con $>10^5$ ufc/ml/no centrifugadas (n=7)			
		ORINA	
		Positiva	Negativa
CÉRVIX	Positiva	2	1
	Negativa	2	2
Correlación		57,1%	

Considerando la detección del VPH en cérvix como “gold estándar”, los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para todas las posibles comparaciones de la detección de VPH en la orina respecto de las muestras cervicales están recogidos en la Tabla 11. La sensibilidad global fue del 84% (95% IC 0,74-0,90) y el VPN del 83,1%. Los valores de sensibilidad oscilaron desde el 90,5% (95% IC 0,8-0,95) para las muestras de orina centrifugadas, al 50% (95% IC 0,25-0,74) para las muestras no centrifugadas. En el caso de las muestras centrifugadas con un bajo recuento bacteriano la sensibilidad llegó al 93,7% (IC 0,71-0,98) y un VPN del 96%.

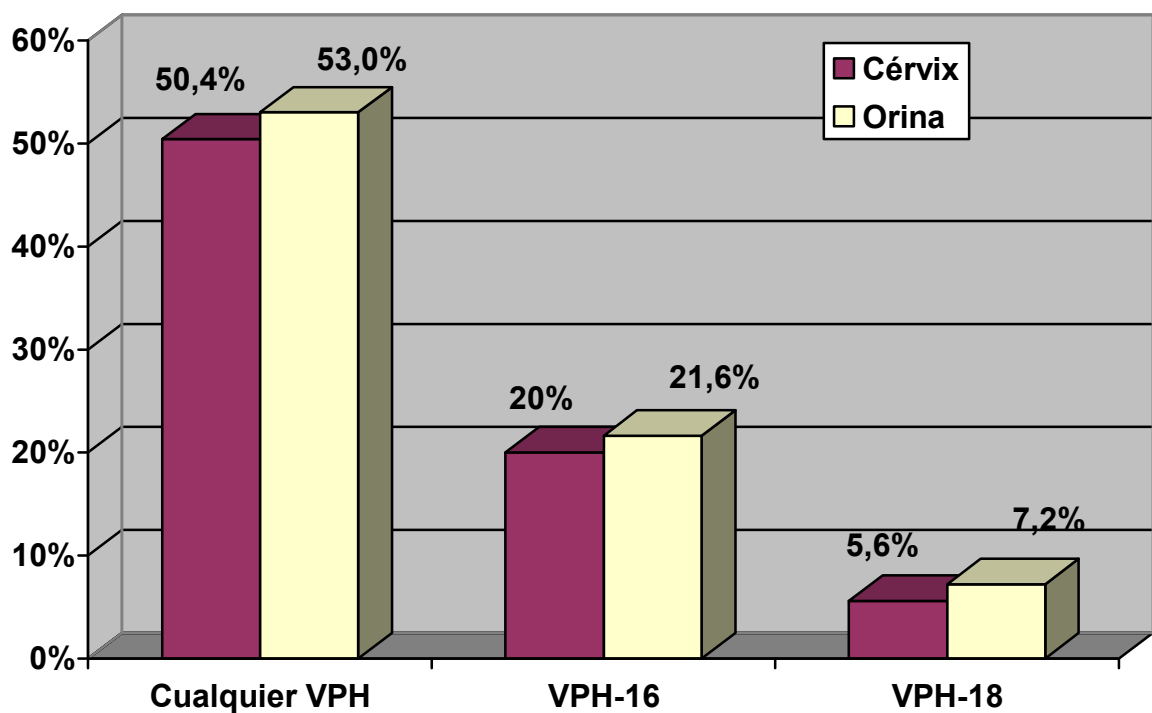
Tabla 11 Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) en la muestra de orina para la detección del VPH según la centrifugación y el recuento bacteriano.

	Todas (n=145)	>10 ⁵ ufc/ml (n=89)	<10 ⁵ ufc/ml (n=56)	centrifugadas (n= 125)	no centrifugadas (n=20)	centrifugadas/>10 ⁵ ufc/ml (n= 82)	centrifugadas/<10 ⁵ ufc/ml (n=43)
Sensibilidad	84%	86,3%	82,6%	90,5%	50%	89,3%	93,7%
Especificidad	84,3%	81,6%	80%	85,5%	75%	82,8%	88,9%
VPN	83,1%	81,6%	87,5%	89,8%	50%	87,5%	96%
VPP	85,1%	86,3%	73,%	86,4%	75%	85,3%	85,7%
Kappa	0,68	0,67	0,61	0,76	0,23	0,72	0,8

9.3. Genotipado del VPH en muestras de orina

Estudiamos la detección de los tipos VPH-16, VPH-18 y el resto de VPH de alto riesgo en conjunto en los casos comparados en el grupo de las muestras de orina centrifugadas (un total de 125 muestras). La prevalencia de VPH fue mayor en orina que en cérvix para todos los tipos de VPH en conjunto, así como para los tipos VPH-16 y VPH-18 específicamente, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Fig. 9).

Fig. 9: Prevalencia del VPH en muestras de cérvix y orina global y para los genotipos VPH-16 y VPH-18



De los 125 casos comparados, 53 fueron negativos para el VPH tanto en cérvix como en orina. En las 72 muestras restantes, la detección del VPH fue positiva en cérvix y/o en orina, el genotipado del VPH fue coincidente en 43 muestras pareadas (59,7%). En 29 muestras (40,3%) hubo alguna discordancia en alguno de los genotipos detectados. De estas discrepancias, en 6 muestras no se detectó ningún tipo del VPH en orina y sí en cérvix. Por el contrario, hubo 9 muestras en las que la detección fue positiva en orina, y negativa en cérvix. En el resto (14 muestras) sí se detectó el VPH tanto en cérvix como en orina, aunque los genotipos detectados fueran distintos (Tabla 12).

Tabla 12 Discrepancias en el genotipado entre muestras de orina y cérvix

Muestras cervicales			Muestras de orina			
VPH-16	VPH-18	VPH-AR ^a	VPH-16	VPH-18	VPH-AR	Nº ufc/ml
P	N	N	N	N	N	1
N	N	P	N	N	N	0
N	P	P	N	N	N	1
N	P	P	N	N	N	1
N	N	P	N	N	N	1
N	N	P	N	N	N	1
P	N	N	P	N	P	0
P	N	P	P	N	N	1
P	N	P	P	N	N	1
P	N	N	P	P	N	1
P	N	N	P	N	P	1
P	N	N	P	N	P	1
P	N	P	N	N	P	0
P	N	P	N	N	P	1
N	N	P	N	P	P	0
N	P	P	P	P	N	1
N	N	P	N	P	P	1
N	N	P	P	N	N	1
N	N	P	N	P	P	1
N	N	P	P	N	P	1
N	N	N	N	N	P	0
N	N	N	N	N	P	0
N	N	N	P	N	N	0
N	N	N	N	N	P	1
N	N	N	N	N	P	1
N	N	N	N	N	P	1
N	N	N	N	N	P	1
N	N	N	N	N	P	1
N	N	N	P	N	P	1
N	N	N	N	N	P	1

a: VPH de alto riesgo excluidos el VPH-16 y VPH-18. 0= <10⁵ ufc/ml. 1= >10⁵ ufc/ml

En la Tabla 13 podemos ver los valores de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de las muestras de orina para cada genotipo individualmente (16, 18 y AR en conjunto) y considerando la detección de los mismos en las muestras de cérvix como “gold standard”. El genotipo VPH-16 se detectó en 25 muestras cervicales. Dicho genotipo también fue detectado su correspondiente orina pareada en 22 de ellas. En 1 muestra no se detectó ningún genotipo en orina, pero en 2 sí se detectaron otros tipos de VPH de AR en orina aunque distintos del VPH-16. Por el contrario, hubo 5 muestras de orina en los que se detectó el VPH-16 en orina y no se detectó en cérvix (en 2 muestras la detección del VPH fue negativa y en 3 muestras se detectaron tipos de VPH de alto riesgo aunque diferentes del VPH-16). Respecto al VPH-18, hubo 5 casos en los que se detectó en ambas muestras. En 2 casos se detectó en cérvix pero no en orina y en 4 casos se detectó en orina pero no en cérvix. Para el genotipo VPH-16 obtuvimos una sensibilidad global del 88% (IC 95%: 0,70-0,95) y un VPN del 96,9% siendo ligeramente superior en las muestras con alto recuento bacteriano. Para el VPH-18 la sensibilidad global fue del 71,4% (IC 95%:0,35-0,91) y el VPN fue del 98,2%. Para este genotipo sí encontramos diferencias entre las muestras según las características microbiológicas de las mismas, de modo que todos los parámetros estadísticos fueron superiores en el grupo con un recuento inferior a 10^5 ufc/ml (Tabla 13).

TABLA 13. Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en orina para la detección de distintos genotipos de VPH.

	Todas las muestras (n=125)			>10 ⁵ ufc/ml (n=82)			<10 ⁵ ufc/ml (n=43)		
	VPH-16	VPH-18	VPH-AR ^a	VPH-16	VPH-18	VPH-AR	VPH-16	VPH-18	VPH-AR
S (%)	88% (0,70-0,95)	71,4% (0,35-0,91)	82% (0,69-0,90)	88,8% (0,67-0,96)	60% (0,23-0,88)	78,3% (0,63-0,88)	85,7% (0,48-0,97)	100% (0,34-1)	92,3% (0,66-0,98)
E (%)	95% (0,88-0,97)	96,6% (0,91-0,98)	85,3% (0,75-0,91)	93,7% (0,85-0,97)	96,1% (0,89-0,98)	82,2% (0,68-0,90)	97,2% (0,85-0,99)	95,5% (0,87-0,99)	90% (0,74-0,96)
VPN (%)	96,9%	98,2%	87,6%	96,7%	97,3%	82,2%	97,2%	100%	96,4%
VPP (%)	78,5%	55,5%	78,8%	80%	55,5	78,3	85,7%	66,6%	80%
Kappa (IC)	0,80 (0,67-0,93)	0,6 (0,3-0,9)	0,68 (0,53-0,8)	0,8 (0,63-0,95)	0,5 (0,1-0,8)	0,60 (0,43-0,77)	0,83 (0,6-1)	0,78 (0,3-1)	0,78 (0,6-0,98)

Entre paréntesis los intervalos de confianza al 95%. a Excluidos el VPH-16 y VPH-18

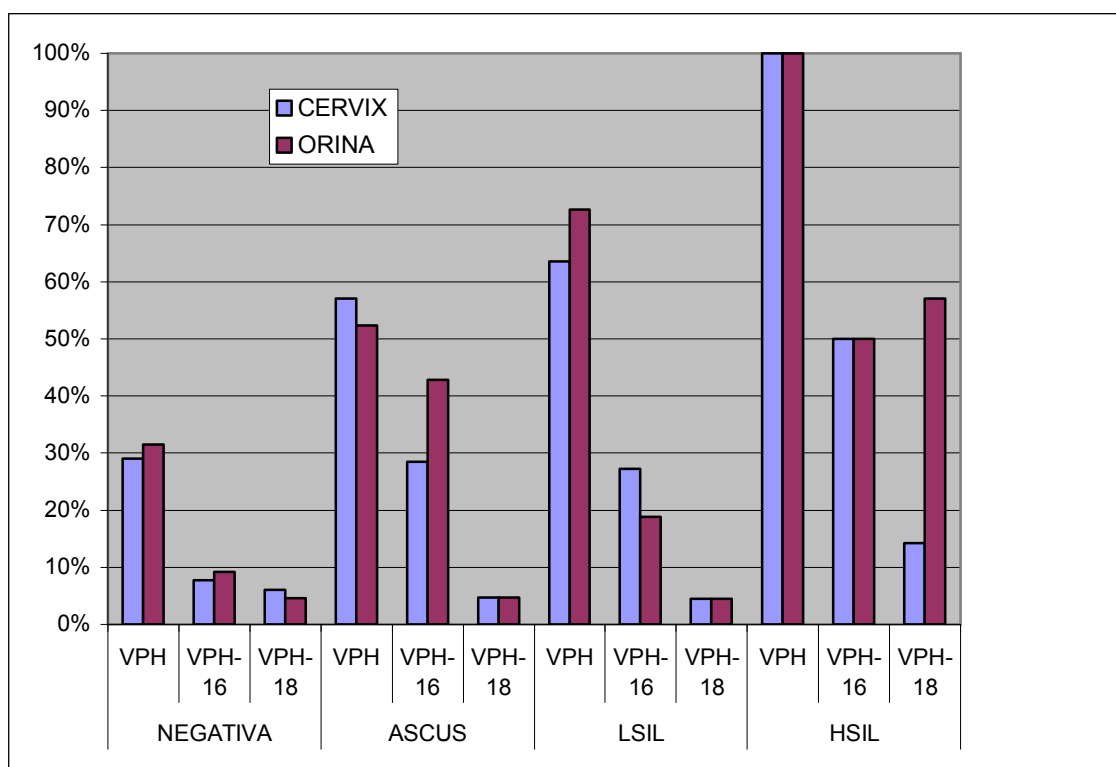
9.4. Evaluación de la detección y genotipado del VPH en muestras de orina respecto del diagnóstico citológico e histológico

De los 125 casos comparados (muestras centrifugadas), los resultados de la citología estuvieron disponibles en 122 mujeres, de las cuales 65 fueron normales, 36 fueron patológicas (22 LSIL y 14 HSIL) y 21 fueron informadas como ASCUS. Los resultados de biopsia estuvieron disponibles para 80 mujeres, de las cuales 43 no tenían CIN, 17 eran CIN1, y 20 eran \geq CIN2-3.

En total, en 18 de las 65 mujeres (27,7%) con el resultado de citología normal y en 28 de las 36 mujeres (77,7%) con citología patológica (LSIL ó HSIL), la detección fue positiva en ambos tipos de muestras. La concordancia (VPH positivo ó negativo) fue mayor en los casos con citología patológica (34/36 casos, $k=0,82$; 95% IC 0,58-1) que en los casos de citología normal (55/65 casos, $k=0,66$; 95% IC 0,47-0,85).

En general, la prevalencia de infección por el VPH (incluidos el VPH-16 y el VPH-18) fue similar en ambos tipos de muestras independientemente del resultado de la citología, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p=0,60$). Además dicha prevalencia aumentó en ambos tipos de muestras conforme a la gravedad de las lesiones citológicas (Fig. 10).

Figura 10. Prevalencia del VPH tanto en orina como en cérvix según los resultados de la citología y para los genotipos VPH-16 y VPH-18.



Citología	n	VPH (todos)		VPH-16		VPH-18	
		Cérvix	Orina	Cérvix	Orina	Cérvix	Orina
Negativa	65	22 (29%)	24 (31,5%)	5 (7,7%)	6 (9,2%)	4 (6,1%)	3 (4,6%)
ASCUS	21	12 (57,1%)	11 (52,3%)	6 (28,5%)	9 (42,8%)	1 (4,7%)	1 (4,7%)
LSIL	22	14 (63,6%)	16 (72,7%)	6 (27,2%)	4 (18,8%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)
HSIL	14	14 (100%)	14 (100%)	7 (50%)	7 (50%)	1 (14,2%)	4 (57,1%)

HSIL: High Grade squamous intraepithelial lesion. LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance

En total se estudiaron 14 mujeres con citología HSIL, siendo la concordancia en la detección del VPH del 100% entre las muestras pareadas. El resultado de la biopsia fue \geq CIN2-3 en todas ellas, salvo en una mujer a la cual que no se le realizó la biopsia.

En las 21 citologías informadas como ASCUS, la detección del VPH fue positiva en 12 muestras cervicales (57,1%) y en 11 de orina (52,3%). En 18 de las mujeres con ASCUS se realizó la biopsia y solo una tuvo un resultado \geq CIN2-3. El resultado en la detección de VPH tanto en cérvix como en orina fue positivo.

En el caso de las muestras con lesiones de bajo grado (LSIL) (22 muestras), en 14 (63,6%) se detectó VPH en cérvix y en 16 (72,7%) en orina. Dispusimos del resultado de la biopsia en 14 muestras. En 3 de ellas, la biopsia se informó como \geq CIN2-3 y el resultado de la detección del VPH fue positivo tanto en cérvix como en orina.

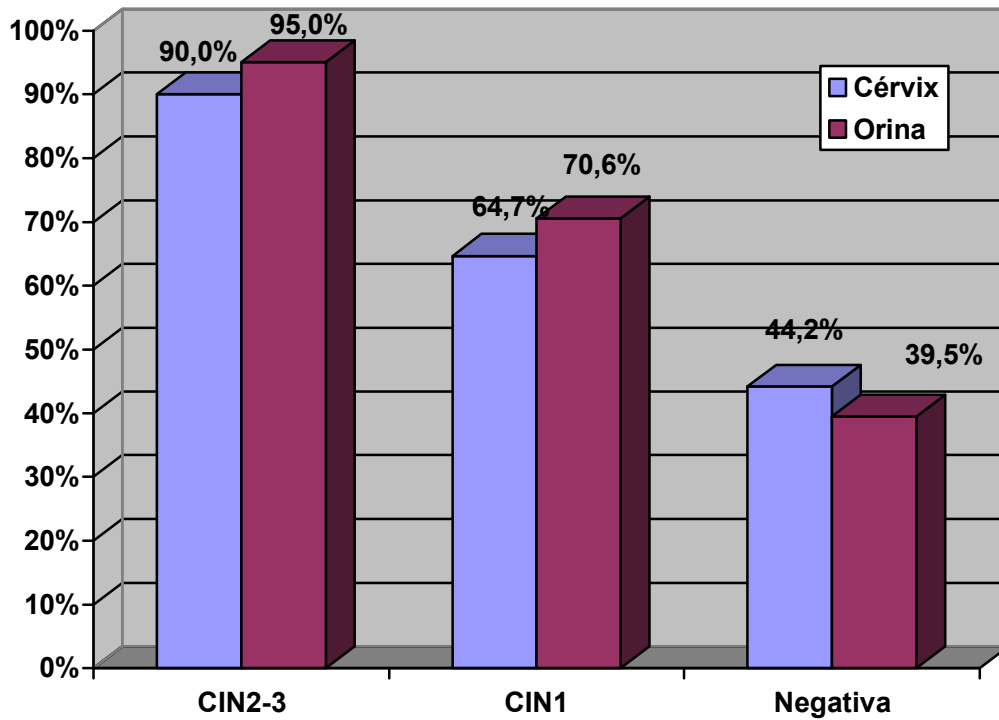
En muestras con citología normal (65 muestras) el VPH fue positivo en 22 muestras cervicales (29%) y en 24 (31,5%) muestras de orina. Solo en 2 mujeres con citología normal, el resultado de la biopsia fue \geq CIN2-3. La detección en cérvix fue negativa en ambas, pero una de ellas fue positiva para VPH en orina.

En cuanto al genotipado específico, la prevalencia del VPH-16 fue superior en las lesiones citológicas de alto grado respecto a las de bajo grado tanto en

cérvix como en orina. La concordancia en las lesiones HSIL fue absoluta (100%). Respecto al VPH-18 también ocurrió lo mismo, con la diferencia que en las HSIL, la prevalencia en orina de dicho genotipo fue muy superior en orina respecto a la detectada en cérvix (57,1% versus 14,2% respectivamente).

Con respecto al diagnóstico histológico, también la prevalencia del VPH tanto en cérvix como en orina aumentó con el grado de severidad de las lesiones histológicas (Fig. 11). El VPH se detectó tanto en cérvix como en orina en todos los casos (14 mujeres) que tuvieron HSIL y CIN2-3 en la citología e histología respectivamente (Tabla 14). Además de las 20 mujeres con resultado en la biopsia \geq CIN2, la detección en cérvix fue positiva en 18 de ellas (90%) y en orina en 19 (95%). El único caso no detectado en orina también fue negativo en cérvix (la citología de esta muestra fue negativa), tratándose de un más que probable falso positivo de la biopsia.

Figura 11. Prevalencia del VPH en cérvix y orina respecto del diagnóstico histológico \geq CIN2-3



CIN. Neoplasia intraepitelial cervical

Tabla 14. Prevalencia de VPH en muestras cervicales y orinas según diferentes resultados de la citología e histología disponibles

Citología	Tipo de muestra	N° Positivos para VPH/N° total con histología de:			
		Negativa	CIN 1	CIN2-3	Global
Negativa	Cervical	12/28	4/7	0/2	16/37
	Orina	10/28	4/7	1/2	15/37
ASCUS	Cervical	5/11	3/3	1/1	9/15
	Orina	4/11	3/3	1/1	8/15
LSIL	Cervical	2/4	4/7	3/3	9/14
	Orina	3/4	5/7	3/3	11/14
HSIL	Cervical	0	0	14/14	14/14
	Orina	0	0	14/14	14/14
Global	Cervical	19/43	11/17	18/20	48/80
	Orina	17/43	12/17	19/20	48/80

CIN. Neoplasia intraepitelial cervical. HSIL: High Grade squamous intraepithelial lesion. LSIL: Low grade squamous intraepithelial lesion. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance

Tomando como “gold standard” el diagnóstico histológico de CIN2-3, la detección del VPH en muestras de orina centrifugadas (independientemente del número de ufc/ml) tuvo una sensibilidad clínica del 95% (95% IC=0,76-0,99) y una especificidad del 52,4% (95% IC=0,40-0,64). El valor predictivo negativo fue del 96,7% y el VPP del 35,6% (Tabla 15). En las muestras cervicales correspondientes, dichos valores fueron 90% (95% IC=0,69-0,97), 50,8% (95% IC=0,38-0,62), 93,4% y 47,36% respectivamente (Tabla 15), no existiendo diferencias estadísticamente significativas (P=1).

Tabla 15 Comparación de la precisión de las muestras de cérvix y orina para la detección de lesiones histológicas \geq CIN 2-3

		VP	FN	FP	VN	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
CIN2-3 (n=20)	Cérvix	18	2	30	30	90 % (0,69-0,97)	50% (0,37-0,62)	93,8 (0,79-0,98)	37,5 (0,25-0,51)
	Orina	19	1	29	31	95 % (0,76-0,99)	52,4 % (0,39-0,64)	96,9 (0,84-0,99)	39,6 (0,25-0,53)

FP: Falso positivo. FN: Falso negativo. VP: Verdadero positivo, VN: Verdadero negativo. Entre paréntesis Intervalos de confianza al 95%. CIN. Neoplasia intraepitelial cervical

10. DISCUSIÓN

La infección por los tipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH) es una causa necesaria aunque de por sí no suficiente para el desarrollo de lesiones precancerosas de cérvix. Entre todos los tipos oncogénicos de VPH, son los tipos 16 y 18 los que están asociados a más del 70% de los cánceres de cérvix (9). La introducción de la citología mediante la tinción de Papanicolau como método de cribado redujo espectacularmente la mortalidad asociada a dichas neoplasias (44-46). No obstante, la citología, que es una técnica asequible desde el punto de vista económico, presenta una serie de inconvenientes:

- Tiene una alta especificidad pero una falta de sensibilidad en la detección de lesiones preneoplásicas (34,48), por lo que estas lesiones pueden pasar desapercibidas en muchas mujeres. Ello implica la necesidad de realizar seguimientos muy frecuentes por el ginecólogo.
- Una Interpretación subjetiva entre los observadores a pesar de los criterios de Bethesda (50,51).
- Problemas en la detección de los adenocarcinomas asociados en su mayor parte al tipo VPH-18 (52,53).
- Problemas de estandarización interlaboratorios
- Dificultades para desarrollar adecuados programas de control de calidad, lo cual se pone de manifiesto en países en vías de desarrollo, que son precisamente donde se produce la mayoría de estos tipos de cánceres.

Las pruebas moleculares de detección del VPH en muestras cervicales se están imponiendo a la citología en los programas de cribado primario por una serie de motivos:

- Mayor sensibilidad (aunque con menor especificidad) en la detección de lesiones preneoplásicas CIN 2 ó superiores (54-61).
- Mayor valor predictivo negativo: disminuye el numero de pruebas/visitas (54-61).
- Mayor reproducibilidad ya que están automatizadas ó semiautomatizadas. Además existen directrices publicadas para validar clínicamente las pruebas moleculares (25)
- Se pueden procesar un elevado número de muestras simultáneamente

Como inconvenientes generales de las pruebas moleculares de detección del VPH:

- Necesita equipamiento más complejo que la citología
- Coste mucho mayor que citología
- Menor especificidad que la citología con lo cual se provoca una mayor tasa de derivaciones a colposcopias (56)

Dada la importancia creciente adquirida por las pruebas moleculares de detección del VPH, existe una disyuntiva entre hacer el cribado primario mediante citología o mediante pruebas moleculares de detección del VPH. Actualmente, los programas de cribado del cáncer de cérvix de la SEGO y de

diferentes sociedades americanas y recomiendan a partir de los 30 años el uso combinado de ambas pruebas (citología y detección de VPH) con intervalos de seguimientos cada 5 años si ambos test son negativos y terminar el cribado a los 65 años (64,65). No obstante cada vez son más los estudios que demuestran la superioridad de la prueba del VPH respecto de la citología. En el estudio de Wright y cols (60) derivado del ATHENA demuestran que la realización de ambas pruebas (citología y prueba de VPH) no aporta beneficio respecto de la realización solamente de la prueba de VPH. En un reciente metaanálisis sobre 4 estudios controlados y randomizados (POBASCAM, SWEDESCREEN, ARTISTIC y NTCC) en 176464 mujeres (54-59) se demuestra que el cribado mediante una prueba de VPH ofrece una protección del 60-70% superior que la citología frente al cáncer invasivo de cérvix. Las últimas tendencias en los programas de cribado avalados por los estudios mencionados, proponen la realización del cribado primario mediante una prueba de detección de VPH de alto riesgo. Sin embargo esta estrategia daría lugar a una elevada tasa de derivación a colposcopia por la menor especificidad sobre todo en mujeres jóvenes menores de 30 años. Por ello, han sido planteadas diversas opciones sobre como realizar el seguimiento a las mujeres positivas a VPH de alto riesgo. Si efectuarlo con citología o bien determinar específicamente la presencia de los tipos 16 y 18 ó bien hacer ambas cosas. En Europa, Holanda ha sido el primer país en establecer un programa de cribado basado en la prueba de VPH seguida de la citología a las mujeres VPH positivas. Esta estrategia está siendo también adoptada en países de América Latina siendo México el país pionero en llevarla a cabo.

En cuanto al genotipado específico, hay un elevado consenso sobre la importancia de detectar los tipos 16 y 18 para priorizar el seguimiento de estas mujeres respecto a las mujeres que tienen otros genotipos de AR o que no están infectadas. Quizás habría que sumar a estos, el genotipo 45 de mayor trascendencia de la que se creía como ha revelado el estudio de Sanjosé (9). En un reciente estudio prospectivo de Shiffman et al (61) en 18756 mujeres, los autores han concluido que solo el genotipado del tipo VHP-16 en mujeres con citología negativa tiene realmente trascendencia para tomar decisiones clínicas. Incluyen también el VPH-18 por la dificultad de la detección de lesiones glandulares producidas por dicho genotipo. Por tanto, según estos autores no es tan importante para tomar decisiones clínicas, diferenciar entre los diferentes tipos de AR (distintos del 16 y 18). Además Huh et al (63) han demostrado que la detección y genotipado simultaneo de los tipos 16 y 18 es coste-efectivo a largo plazo respecto a otras estrategias de cribado.

El test HPV Cobas 4800 cumple los criterios de Meijer (25) para poder ser utilizado en el cribado de cáncer de cérvix. Está diseñado para ganar tiempo en la toma de decisiones clínicas ya que en una sola prueba/visita/muestra permite realizar el cribado (VPH + ó -) y simultáneamente el genotipado de los tipos 16 y 18. El test se puede realizar directamente en muestra primaria, está disponible comercialmente con marcado CE para diagnóstico in vitro y aprobado por la FDA.

Por eso uno de los objetivos de este trabajo fue comprobar si nuestros resultados con este test eran clínicamente equivalentes a los que se obtienen

realizando 2 pruebas secuencialmente: un primer test de cribado con el Cobas Amplicor que detecta las infecciones por VPH de alto riesgo en conjunto, seguido de un test de genotipado específico con el Linear Array para las muestras positivas.

Esta primera comparación se realizó sobre 340 muestras de mujeres que acudían a la consulta de diagnóstico precoz para su seguimiento habitual. La correlación entre el Cobas 4800 HPV Test y el test Amplicor para la detección del VPH en conjunto fue excelente (92.2%) con solo 11 muestras (3.2%) que no fueron detectados por el test Cobas 4800. Ninguna de las discrepancias tuvo lugar en mujeres con lesiones cervicales de alto grado (HSIL). Además de esas 11 muestras discrepantes, solamente 5 pudieron ser genotipadas con el Linear Array, mientras que las otras 6 fueron negativas a pesar de ser positivas para el test Amplicor. Estas discrepancias podrían ser explicadas como falsos positivos del Amplicor o bien por la diferencia de sensibilidad analítica respecto del Linear Array y del test Cobas 4800 que se pone de manifiesto especialmente en muestras con baja carga viral.

El test Cobas 4800 detectó hasta 13 infecciones que no detectó el Amplicor, aunque ninguna de ellas correspondieron a mujeres con lesiones de alto grado. Podría haber sido de interés haber probado con el Linear Array estas 13 muestras, pero la probabilidad de que pudieran ser genotipadas es muy baja ya que la sensibilidad analítica del Linear Array es inferior a la del Cobas Amplicor, y solamente perderíamos el genotipo VPH 66 ya que éste, no está incluido entre los genotipos que pueden ser detectados con el test Amplicor.

Por tanto, consideramos que el test Cobas 4800 HPV es comparable al Amplicor para la detección rutinaria de la infección por el VPH de alto riesgo en muestras cervicales.

Por otra parte, cuando comparamos el resultado final del test Cobas 4800 HPV (detección positiva ó negativa del VPH más genotipado simultaneo) con el resultado final obtenido con la combinación del Amplicor (detección) más el Linear Array (genotipado), encontramos una excelente correlación (92.7% kappa = 0.872) similar a la encontrada en el estudio de Castle (35). Además para los tipos más óncogénicos, ésta correlación aumentó al 94,3% para el tipo VPH-16 y al 97% para el VPH-18. Separando los tipos de VPH según el riesgo asociado al cáncer (16>18>AR) encontraron diferencias entre ellos con una mayor tendencia a la positividad para los tipos de AR en el Linear Array que no eran detectados por el Cobas 4800, mientras que en nuestro estudio no encontramos diferencias entre los distintos tipos (35).

Cuando clasificamos los resultados en función de los resultados de la citología, obtuvimos una excelente concordancia entre ambas estrategias independientemente del resultado de la misma (concordancia >89%, kappa >= 0.76). En concreto, para las mujeres con HSIL (24 mujeres), la concordancia en la detección del VPH fue del 100%, aunque hubo 3 muestras discrepantes en cuanto al genotipo detectado. En el estudio de Castle y col (35) detectaron una mayor tendencia a la positividad del Linear Array en mujeres que no tenían patología cervical.

Nuestra conclusión de esta primera comparación fue que con el test Cobas 4800 podía obtenerse la misma información clínica (cribado positivo/negativo y derivación a colposcopia según genotipo) y en mucho menor tiempo que realizando primero un test de cribado seguido de un segundo test de genotipado específico.

Uno de los grandes problemas de los programas de cribado de cáncer de cérvix independientemente de que se basen en la citología y/o pruebas de detección del VPH, es la falta de cobertura poblacional, es decir, bien porque las mujeres no acuden a un ginecólogo a pasar revisiones periódicas de modo que cuando se detecta la patología es demasiado tarde, o bien porque no se ha establecido un programa oficial de cribado. En España se ha demostrado que hasta en un 80% de los casos de cáncer de cérvix las mujeres carecían de una historia previa de citología (44). Esto puede ser debido a varios motivos:

- Problemas culturales, étnicos ó religiosos
- Falta de información
- Falta de percepción del riesgo
- Vergüenza a una exploración ginecológica

Por otra parte, otro de los grandes problemas de los programas de cribado es que se basan en la toma de una muestra endocervical tras una exploración pélvica lo cual requiere una cierta infraestructura sanitaria que no siempre está disponible especialmente en países en vías de desarrollo.

La toma de muestras no invasivas como la autotoma vaginal o la orina podría ayudar a salvar parte de estas barreras e incrementar la cobertura poblacional ya que además son más confortables para las mujeres (69-74). Algunos estudios a gran escala en mujeres que no han respondido a la invitación de participar en un programa de cribado, han mostrado que la oferta de autotoma de muestras para la detección de VPH constituye una alternativa eficaz que atrae hasta el 30% de las mujeres que no participan en el cribado (69-74). En este grupo de autotomas estarían los exudados cervico-vaginales y también las muestras de orina que pueden ser tomadas por la propia mujer en casa.

El segundo objetivo principal de este estudio era validar y estandarizar la muestra de orina para la detección del VPH y de lesiones pre-neoplásicas en el contexto de una consulta de diagnóstico precoz de cáncer cervical donde la prevalencia de infecciones por VPH es muy alta. En caso de resultados concordantes en las muestras de cérvix/orina y dado el elevado valor predictivo negativo de la prueba de VPH podría establecerse un protocolo conjunto con la Unidad de Ginecología de modo que las mujeres llevaran las muestras de orina a su Centro de Salud para que las transportaran al laboratorio de Microbiología y en caso de ser negativas no citarlas hasta pasados 3-4 años evitando una exploración ginecológica y la realización de pruebas diagnósticas (citologías, colposcopias y biopsias) probablemente innecesarias.

La primera duda que se puede plantear es el posible origen del ADN del VPH en la orina, es decir ¿qué significado tiene la presencia de ADN del VPH en la

orina de una mujer?. El VPH no tiene tropismo por las células de la mucosa vesical pero sí por las del epitelio uretral y vulvar, por tanto, la presencia del VPH en la orina puede reflejar la presencia de células descamativas infectadas procedentes no solamente del cérvix sino también de otras localizaciones anatómicas. Sin embargo, en diversos estudios (93,97) se ha demostrado una alta tasa de concordancia en el genotipado específico de muestras pareadas de cérvix y orina sugiriendo el origen cervical del VPH de la orina.

En nuestro estudio incluimos 145 muestras pareadas de cérvix y orina de una población de mujeres con una esperada alta prevalencia de infección por VPH ya que dichas mujeres habían tenido resultados anómalos en citologías previas. Un primer resultado que obtuvimos fue que no hubo ninguna muestra de orina con resultado no válido, es decir, en todas las muestras de orina procesadas con resultado negativo para VPH, el control interno de la β -globina fue positivo, confirmando la validez del método de extracción (equipo Cobas 480 X). Este dato es muy significativo, ya que implica por una parte, que la reacción de PCR no se afectó por la presencia de posibles inhibidores en la orina y por otra, la presencia de células descamativas capaces de albergar el virus en las muestras de orina analizadas.

La prevalencia global del VPH (incluidos todos los tipos de alto riesgo) para los 145 casos comparados, fue similar en la orina que en las muestras cervicales (en torno al 51%). La mayoría de los estudios publicados (102) muestran una mayor prevalencia de VPH en cérvix respecto de la orina salvo los estudios de Rymark et cols (78) y Cuschieri y cols (92) los cuales encuentran una mayor

prevalencia en orina que en cérvix. En nuestro estudio, en el subgrupo de muestras con una mayor correlación entre cérvix y orina (orinas centrifugadas), la prevalencia fue algo superior en orina (53%) que en cérvix (50,4%) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta mayor prevalencia en la orina que en cérvix podría ser explicada, al menos en parte por la presencia de ADN del VPH de origen vulvar o uretral.

Cuando calculamos globalmente los resultados de la detección del VPH para el total de las 145 muestras pareadas de cérvix/orina, la sensibilidad obtenida fue del 84% y el índice Kappa de concordancia de 0.68 que puede ser calificado de moderado-alto aunque claramente no satisfactorio. Esta baja sensibilidad podría explicarse en principio a que la carga viral en orina es al menos 50 veces inferior a la muestra cervical como está demostrado en los estudios anteriormente mencionados (88,89).

Pero desglosando las muestras de orina de nuestro estudio en distintos subgrupos encontramos diferencias significativas en los resultados obtenidos. En ese sentido, analizamos dos variables: la centrifugación previa de las orinas y las características microbiológicas de las mismas (medida en forma de número de ufc/ml aisladas en agar sangre). En cuanto a la centrifugación, la mayoría de los estudios publicados (101,102) emplean los primeros 10-20 ml de la primera parte de la micción (con objeto de recoger la mayor cantidad de células descamativas) y luego centrifugan y lavan 1 ó 2 veces el sedimento. Nosotros analizamos un primer grupo de 20 muestras de menos de 20 ml de la primera parte de la micción directamente sin centrifugar, de forma análoga a

como se hace en las técnicas de detección de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (75-77). En este grupo, obtuvimos una sensibilidad muy baja del 50% y una concordancia inaceptable ($k=0.23$). De los 12 falsos negativos sobre el total de las 145 muestras procesadas, 6 se correspondieron a este tipo de muestras. Una posible explicación puede ser que al añadir la muestra completa al medio Preservcyt (15 ml aproximadamente) obviamente se produjo una gran dilución y por tanto mayor probabilidad de falsos negativos; aunque por otra parte, al no centrifugar no había posibilidad de perder ADN soluble del VPH en el proceso de centrifugación. En cambio, cuando centrifugamos las muestras (volúmenes mayores de 20 ml) la sensibilidad aumentó al 90,5% y el índice kappa obtenido osciló entre 0.75 y 0.77 para distintos volúmenes de orina procesados. Al emplear volúmenes mayores y centrifugar, había mayor cantidad de ADN del VPH y el pellet se diluyó menos (en 5 ml de sobrenadante que además podría incluir el ADN soluble extracelular) y por tanto mayor posibilidad de ser amplificado. Quizás una solución fuera centrifugar siempre la orina aunque el volumen recibido sea pequeño.

Otro factor analizado fueron las características microbiológicas de las muestras de orina. Teóricamente, una muestra con un recuento bacteriano con un alto número de ufc/ml podría ser un indicador indirecto de un elevado contenido de células descamativas (de origen cervical ó no) y por tanto una mayor posibilidad de detectar el VPH. Aunque también una mayor cantidad de inhibidores y una mayor interferencia con la reacción de PCR. Con el objetivo de ver si este hecho podía interferir en la detección del VPH en la orina,

sembramos todas las orinas en una placa de agar sangre a 37°C, se incubaron durante 24 horas e hicimos el recuento de ufc/ml sin identificar tipos bacterianos. Teniendo en cuenta solo este factor, nuestros resultados fueron similares para muestras con recuento menor de 10^5 ufc/ml que para muestras altamente contaminadas (κ 0.67 frente a 0.61 respectivamente).

No obstante, considerando ambos factores a la vez (centrifugación y microbiología) sí que encontramos diferencias en los parámetros estadísticos. La sensibilidad subió al 93,7%, con un VPN del 96% y una concordancia casi perfecta ($k= 0,80$) para el subgrupo de muestras de orina centrifugadas (volumen mayor de 20 ml) y con recuento bajo de ufc/ml.

Hay en la literatura numerosas publicaciones sobre la utilización de la orina para la detección del VPH (78-98). La gran heterogeneidad en el diseño de dichos estudios impiden hacer un metaanálisis con garantías de obtener conclusiones aceptables (99-101). Hemos comparado nuestros resultados con otros estudios similares respecto a la población estudiada (es decir de alta prevalencia de VPH). La sensibilidad calculada en nuestro estudio (93,7%) fue superior a la publicada en dichos estudios. Los mejores resultados los obtuvieron Payan y col (88) empleando una técnica no comercial de PCR a tiempo real con la que obtuvieron unos resultados de sensibilidad del 91,2%, ($k=0.93$). En este estudio consideran todos los tipos de VPH en conjunto sin diferenciar entre tipos de alto y bajo riesgo oncogénico. Tanzi et al (93) empleando una técnica de PCR casera en una población de mujeres VIH positivas encontraron una concordancia casi perfecta ($k=0.96$), y una

sensibilidad del 98,6%. Pero cuando separan el grupo de los VPH de alto riesgo, el valor kappa fue 0,80 similar al nuestro. Sahasrabuddhe y cols (97) utilizando el Linear Array han publicado una concordancia del 79,2% con $k=0.55$ y Méndez et al (96) en un grupo de mujeres con citología anormal y también con Linear Array, obtuvieron una correlación del 70% (k no calculado) para los VPH de alto riesgo. En cambio, Muñoz et al (94) en otro estudio de mujeres VIH + con PCR casera y primers para algunos VPH de AR encuentran una muy pobre concordancia y una sensibilidad del 68,8%. Otros estudios como el Cuschieri et al (92) tuvieron un índice kappa de 0,60 para los tipos de VPH de alto riesgo. Bisset et al (91) en un estudio considerando solo los tipos de AR encuentran una concordancia similar a la nuestra ($k=0.78$). Franciscato et al (98) en una población de embarazadas con una baja prevalencia y estudiando solo genotipos de alto riesgo oncogénico encontraron una concordancia de 0.77 y una sensibilidad del 84%, pero utilizando una PCR casera y haciendo la comparación con muestras vaginales en lugar de cervicales.

Por tanto, nuestros resultados de sensibilidad y VPN en el grupo de orinas seleccionadas con el test Cobas 4800 son superiores a los de otras tecnologías y avalan la utilidad de la orina para el cribado de la infección por el VPH en mujeres con alta prevalencia de infección.

En cuanto al genotipado específico, hicimos el análisis en el subgrupo de orinas centrifugadas ($n=125$) ya que en las otras la correlación era muy baja. La prevalencia fue similar aunque ligeramente superior en orina para la

infección por VPH en general y para los tipos VPH-16 y VPH-18 en concreto. De todas las discrepancias encontradas, únicamente 6 podrían calificarse de muy graves, puesto que no solo no coincidía el genotipado, sino que tampoco se detectó ningún tipo VPH en esas muestras de orina. El resto de las discrepancias fueron menores ya que aunque no coincidieran los genotipos, al menos si se detectó algún tipo de VPH. No encontramos diferencias según las características microbiológicas de las muestras para el tipo VPH-16 aunque sí para el tipo VPH-18. La sensibilidad para la detección del genotipo VPH-16 osciló entre el 88% (orinas con recuento mayor de 10^5 ufc/ml) y el 85,7% (orinas con recuento inferior a 10^5 ufc/ml) con un índice kappa global igual a 0,80. Mientras que para el genotipo VPH-18 los valores estadísticos fueron muy superiores en el caso de las orinas con recuento bajo siendo la sensibilidad en este caso del 100%. Nuestros resultados para el genotipo VPH-16 son similares a los publicados por Tanzi y cols (93)($k=0,85$) y Bisset (91) ($k=0,80$) y superiores a otros estudios similares. Por ejemplo Song y cols (87), encuentran una sensibilidad del 66% y una correlación muy inferior ($k=0,64$). Daponte y cols (86) obtuvieron una sensibilidad del 70% con $k=0,74$. Cuschieri y cols (92) empleando la técnica de InnoLipa obtuvieron una sensibilidad del 76,9% y una pobre correlación ($k=0,48$).

Analizando los resultados en función de los resultados de la citología, la prevalencia del VPH tanto en orina como en cérvix fue similar independientemente del resultado de la citología y aumentó conforme a la mayor gravedad de las lesiones citológicas (100% en los casos de HSIL). Este resultado es concordante con otros estudios publicados (83,87,92). Al igual que

Sahasrabuddhe y cols (97) encontramos una prevalencia del VPH-16 superior según la severidad de las lesiones cervicales, con una concordancia del 100% en el caso de las lesiones HSIL. La concordancia entre ambas muestras a su vez aumentó en los casos de citología patológica respecto a los de citología normal. El hecho de que la prevalencia de los tipos de alto riesgo sea mayor cuanto mayor es el grado de la lesión cervical era algo ya conocido para la detección en del VPH en cérvix (92,98) pero el hecho de que esto pase también en la detección en orina es una evidencia más para el hecho de utilizar la orina para el cribado del VPH. En cuanto al genotipado específico, la prevalencia también fue similar para los tipos VPH-16 y VPH-18, salvo para este último genotipo en las lesiones tipo HSIL, en los cuales la prevalencia fue muy superior en la orina (57,1%) que en cérvix (14,2%) aunque son pocos casos como para sacar conclusiones.

Además de que la sensibilidad global para detectar el VPH en orina fue muy alta (93,7% en los casos más favorables), la sensibilidad clínica que encontramos en nuestro trabajo también fue muy alta. Lo realmente interesante de una prueba de cribado es que tenga una alta sensibilidad clínica es decir su capacidad para detectar los individuos enfermos (en nuestro caso las mujeres con lesiones \geq CIN2-3). Está demostrado que la contaminación de la orina con células cervicales infectadas y exfoliadas aumenta con la severidad de las lesiones cervicales y bajo estas circunstancias, la detección del VPH en orina refleja estrechamente una infección cervical. Por ello, más allá de la concordancia con las muestras de cérvix pareadas, estudiamos la sensibilidad clínica y valor predictivo negativo (VPN) de la detección del VPH en orina

tomando como “cut-off” la presencia de lesiones \geq CIN2-3 en las mujeres estudiadas. Dispusimos de los resultados de la biopsia en 80 mujeres de las cuales el 25% (20 mujeres) tenían este tipo de lesiones. Detectamos el VPH en la orina en 19 de ellas (95%). El único falso negativo encontrado, fue también negativo en la muestra cervical correspondiente y la citología no detectó lesión alguna, por lo que resulta probable algún tipo de error en el resultado de la biopsia. La sensibilidad y el VPN en orina fueron superiores incluso a los valores obtenidos con muestras cervicales (95% y 96,7% versus 90% y 93,4% respectivamente, Tabla 15). No existen muchos estudios que hayan utilizado el resultado histológico como medida de la eficacia de la determinación del VPH en la orina. En un estudio similar Sahasrabuddhe y cols (97) han publicado unos resultados inferiores a los nuestros (Sensibilidad=80,8% y VPN=82,8% respectivamente). Por el contrario, Mendez et al (96) obtuvieron hasta un 8% de falsos negativos en orina en mujeres con lesiones \geq CIN 2 por lo que no recomiendan el uso de la orina para la detección del VPH. Por otra parte, la especificidad fue similar en cérvix y orina (en torno al 50%), por lo que la tasa teórica de derivación a colposcopia sería similar con ambos tipos de muestra.

La diferencia de nuestro estudio con los demás trabajos anteriormente mencionados, es la utilización del test Cobas HPV 4800 basado en la técnica de PCR a tiempo real, el cual está disponible comercialmente, aunque validado clínicamente solo para muestras cervicales. Con dicho test, en un único paso, podemos separar aquellas mujeres con un mayor riesgo de presentar lesiones de alto grado ahora o en un futuro (infectadas por los tipos 16 y/o 18) y simultáneamente aquellas en las que el riesgo es menor (infectadas por tipos

de AR) o no están en riesgo (sin infección por VPH). Muchos de los trabajos publicados emplean técnicas de PCR caseras (86,90,93), otros trabajos no diferencian entre tipos de alto y bajo riesgo (88); en otros casos, solo consideran algunos de los tipos AR junto con el 6 y el 11 (de significado claramente diferente) (94). Los que se basan en la detección mediante hibridación reversa (Linear Array ó Innolipa) (92,96,97), sí que revelan todos los tipos de VPH individualmente (AR y BR) pero previamente hay que hacer una PCR y requieren una mayor dedicación y tiempo. La detección del VPH en orina con el test Cobas HPV 4800 está totalmente automatizada (salvo la preparación de la orina) con menor riesgo de errores de procesamiento, menor riesgo de contaminaciones, con reactivos disponibles comercialmente y el resultado completo está disponible en 4 horas aproximadamente. Además incluimos la variable de las características microbiológicas de las muestras como un factor adicional a la hora de explicar los resultados.

Los resultados anteriormente reflejados avalan la utilización de la orina con el test Cobas 4800 VPH como muestra adecuada para el cribado y la detección de lesiones preneoplásicas de cérvix únicamente en una población de mujeres con una esperada alta prevalencia de infección por el VPH. Son necesarios más trabajos para validar la utilidad de la muestra de orina en la población general (mujeres no cribadas previamente) con una baja prevalencia de infección por VPH.

Obviamente la mayor utilidad de la muestra de orina tendrá lugar en poblaciones con acceso difícil a los recursos sociosanitarios y sobre todo

cuando las pruebas moleculares se impongan definitivamente como prueba inicial en el cribado de cáncer de cérvix, puesto que mientras coexista con la citología, no tiene sentido que si a una mujer se le hace una exploración ginecológica, no se aproveche el mismo acto para hacer una toma cervical para la detección del VPH.

Además la muestra de orina podría tener gran valor para realizar estudios de prevalencia de infección por VPH a gran escala con fines epidemiológicos (92, 102).

11. CONCLUSIONES

1. La correlación del test Cobas 4800 HPV respecto a la combinación del test Amplicor seguido del Linear Array para la detección de infecciones por VPH de alto riesgo fue excelente (92,7%) proporcionando la misma información clínica pero de forma mucho más automatizada y obteniendo los resultados más rápidamente.
2. La correlación entre ambas estrategias fue excelente independientemente del resultado de la citología especialmente en las mujeres diagnosticadas de HSIL.
3. La orina es una muestra adecuada para la detección del ADN del VPH con el Cobas 4800 HPV test, ya que en todas las muestra el gen de la beta-globina pudo ser amplificado.
4. La utilización de la orina para el diagnóstico de infecciones por VPH con el test Cobas 4800 HPV puede ser una alternativa válida a su detección en las muestras cervicales.
5. La centrifugación de al menos 20 ml de orina y recuentos $< 10^5$ ufc/ml aumentan significativamente la eficacia diagnóstica del test alcanzándose una sensibilidad del 93,7% y una concordancia excelente ($k=0,80$). Cuando se procesó un volumen de muestra mayor de 20 ml, la concordancia fue muy mala y por tanto la orina en este tipo de condiciones no debería emplearse para la detección del VPH
6. La negatividad en la detección del ADN del VPH en muestras de orina centrifugadas descarta la infección a nivel de cérvix con un alto valor predictivo negativo (96%).

7. La sensibilidad para el genotipado individual del VPH en muestras de orina fue del 88% para el VPH-16 y del 71,4% para el VPH-18. Esta sensibilidad aumentó hasta el 100% para el tipo VPH-18, en caso de orinas con un recuento inferior a $<10^5$ ufc/ml. El valor predictivo negativo para todos los genotipos de VPH fue $>96\%$ en este tipo de muestras.
8. La prevalencia del VPH en la orina fue similar a la prevalencia en cérvix independientemente del resultado de la citología de la mujer. Dicha prevalencia aumentó conforme a la gravedad de las lesiones citológicas.
9. La concordancia entre ambos tipos de muestras aumentó en las muestras patológicas respecto de las mujeres con citología negativa.
10. La detección de ADN del VPH en muestras de orina tuvo una excelente sensibilidad (95%) y un elevado valor predictivo negativo (96,7%) para la detección de lesiones pre-neoplásicas \geq CIN 2-3. Asimismo la especificidad fue similar en cérvix y orina (50,8% y 52,4% respectivamente) por lo que la tasa de derivación a colposcopia fue similar en ambos casos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(2):F55-78
2. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KY, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 189: 12–19
3. Muñoz N, Bosh FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
4. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJL, Shah KV. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244-65
5. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S et al. Worldwide human papillomavirus aetiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: Implication for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Mar 1;98:303-15
6. Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), and HPV vaccines. Key points for policy-makers and health professionals. Geneva, World Health Organization, December 2008 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_RHR_08.14_eng.pdf, accessed 10 December 2009).
7. Curado MP, Edwards BK, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanui M et al. Cancer incidence in five continents. Vol. IX (9). Lyon, France: IARC Press, 2007.

8. Shiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types; addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 2009 Jun 1;4:8
9. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. 2010 *Lancet oncol* Nov;11(11):1048-56.
10. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 100, A Review of Human Carcinogens. Part B: Biological Agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2011
11. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco E. Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection Vaccine. 2006; 24 suppl 3:52-61.
12. Aral SO, Holmes KK. Social and behavioral determinants of epidemiology of STDs: industrialized and developing countries. In: Holmes KK, Mardh P-A, Sparling PF, et al., editors. Sexually transmitted diseases. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 39–76
13. de Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. Jul;7(7):453-9. Review
14. Schiffman M; Castle PE; Jerónimo J; Rodríguez AC; Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007 Sep 8;370(9590):890-907
15. <http://www.who.int/hpvcentre/en/>

16. La situación del cáncer en España. Área de epidemiología ambiental y cáncer. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro de publicaciones. Madrid. 2005. Disponible en: <http://cne.isciii.es/morta/>. (Acceso 13 de Octubre de 2009).
17. Proceso asistencial Integrado (PAI) "Cáncer de cérvix". Consejería de Salud, Junta de Andalucía 2ª edición, noviembre de 2010
18. Bernard H-U, Buró RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010 May 25;401(1):70-9
19. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernar HU, zur Hausen H. Classification of papillomavirus. *Virology* Jun 20;324(1):17-27
20. Ausina V, Moreno S. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2006, Ed. Médica Panamericana
21. Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin cancer Biol* 1999 Dec;9(6):423-30
22. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. Mar;32 Suppl 1:S43-51
23. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic Acid Tests for the Detection of Alpha Human Papillomaviruses Vaccine. *Nov* 20;30 Suppl 5:F100-6
24. Hesselink AT, van Ham MAPC, Heideman DAM, Groothuisink ZMA, Rozendaal L, Berkhof J, et al. Comparison of GP5_/6_-PCR and SPF10-Line Blot Assays for Detection of High-Risk Human Papillomavirus in

- Samples from Women with Normal Cytology Results Who Develop Grade 3 Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct;46(10):3215-21
25. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink A, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women of 30 years and older. 2009 *Int J Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):516-20
26. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJLM, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: A summary of meta-analyses. *Vaccine.* 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/78-89
27. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, et al. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou Screening Tests for Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 2007 Oct 18;357(16):1579-88
28. Tsiodras S, Georgoulakis J, Chranioti A, Voulgaris Z, Pssyrri, Tsivilika A, et al. Hybrid capture vs. PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. *BMC Cancer.* 2010 Feb 22;10:53
29. Mo LZ, Monnier-Benoit S, Kantelip B, Petitjean A, Riethmuller D, Pretet JL, et al. Comparison of Amplicor and Hybrid capture II assays for high risk HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology: Use of INNO-LiPA genotyping assay to screen the discordant results. *J Clin Virol.* 2008 Feb;41(2):104-10
30. De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. Comparison of the AMPLICOR Human Papillomavirus Test

- and the Hybrid Capture 2 Assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. *J Virol Methods*. 2008 Jan;147(1):10-7
31. Dufresne S, Sauthier P, Mayrand MH, Petignat P, Provencher D, Drouin P, et al. Human Papillomavirus (HPV) DNA Triage of Women with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance with Amplicor HPV and Hybrid Capture 2 Assays for Detection of High-Grade Lesions of the Uterine Cervix. *J Clin Microbiol*. 2011 Jan;49(1):48-53
32. Monsonego J, Pollini G, Evrard MJ, Sedanoui P, Monfort L, Zerat L, et al. Detection of human papillomavirus genotypes among high-risk women: a comparison of hybrid capture and linear array tests. *Sex Transm Dis*. 2008 May;35(5):521-7
33. Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M. Human Papillomavirus Genotype Specificity of Hybrid Capture 2. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug;46(8):2595-604
34. Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL, and the ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) HPV Study Group High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology. Results From the ATHENA HPV Study. *Am J Clin Pathol*. 2011 Mar;135(3):468-75
35. Castle PE, Sadorra M, Lau T, Aldrich C, García FRA, Kornegay J. Evaluation of a prototype Real-Time PCR assay for carcinogenic Human Papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV Genotyping 16 (HPV 16) and HPV 18 Genotyping. *J Clin Microbiol*. 2009 Oct;47(10):3344-7

36. Heideman DAM, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers WJG, Daalmeijer NF, et al. Clinical Validation of the Cobas 4800 HPV Test for Cervical Screening Purposes. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3983-5
37. Lindeman ML, Dominguez MJ, de Antonio JC, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. Analytical Comparison of the Cobas HPV test with Hybrid Capture 2 for the detection of High-Risk HPV genotypes. *J Mol Diagn.* 2012 Jan;14(1):65-70.
38. Depuydt CE, Benoy IH, Beert JF, Criel AM, Bogers JJ, Arbyn M. Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec;50(12):4073-7
39. Lapierre SG, Sauthier P, Mayrand MH, Dufresne S, Petignat P, Provencher D, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with Cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1240-4
40. Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiric H, Penaranda G, Martineau A, et al. Evaluation of the clinical performance of the Abbott Real Time High-Risk HPV for carcinogenic HPV detection. *J Clin Virol.* 2010 Aug;48(4):246-50
41. Jentschke M, Soergel P, Lange V, Kocjan B, Doerk T, Luyten A, et al. Evaluation of a new multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of human papillomavirus infections in a referral population. *Int J Gynecol Cancer.* 2012 Jul;22(6):1050-6

42. Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of Human papillomavirus Prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F123-38.
43. Turner HC, Baussano I, Garnett GP. Vaccinating Women Previously Exposed to Human Papillomavirus: A Cost-Effectiveness Analysis of the Bivalent Vaccine. *PLoS One*. 2013 Sep 26;8(9):e75552
44. Sasieni P, Adams J. Effect of screening on cervical cancer mortality in England and Wales: Analysis of trends with an age period cohort model. *BMJ*. 1999 May 8;318(7193):1244-5.
45. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention—cervical screening: Science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2007 Dec;34(4):739-60.
46. Informe global de U.S.Preventive Services Task Force (USP-STF). Disponible en: <http://www.ahrq.gov/clinic/3rduspstf/cervcan/cervcanrr/.htm#clinica>
47. de Sanjosé S, Alejo M, Combalia N, Culubret M, Tarroch X, Badal JM, et al. Screening history in women with infiltrating uterine cancer. *Gac Sanit*. 2006 Mar-Apr;20(2):166-7
48. Cuzick J, Clavel C, Petry K, Meijer CJLM, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):1095-101
49. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. 2002; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop: The 2001

- Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002 Apr 24;287(16):2114-9
50. Monsonego J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. 2004. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer*. 2004 Jan 20;108(3):329-33.
51. Jin XW, Sikon A, Yen-Lieberman B. Cervical cancer screening: Less testing, smarter testing. *Cleve Clin J Med*. 2011 Nov;78(11):737-47.
52. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The Rising Incidence of Adenocarcinoma Relative to Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix in the United States—A 24-Year Population-Based Study. *Gynecol Oncol*. 2000 Aug;78(2):97-105
53. Safaeian M, Schiffman M, Gage J, Solomon D, Wheeler CM, and Castle PE. Detection of Precancerous Cervical Lesions Is Differential by Human Papillomavirus Type. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69(8):3262-6
54. Arbyn M, Ronco G, Meijer CJLM, Naucler P. Trials comparing cytology with human papillomavirus screening. *Lancet Oncol*. 2009 Oct;10(10):935-6.
55. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al and the New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010 Mar;11(3):249-57.
56. Bulkmands NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJP, Bulk S, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of

- cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*. 2007 Nov 24;370(9601):1764-72.
57. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkmands NWJ, Heideman DAM, et al. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):78-88
58. Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B et al. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009 Jul;10(7):672-82.
59. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al, International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014 Feb 8;383(9916):524-32.
60. Wright Jr TC, Castle PE, Apple R, Sharma A, Behrens CM. Risk of >CIN3 after 3 years of follow-up in the ATHENA trial. EUROGIN 2013
61. Shiffman M, Kinney W, Burk RD, Castle PE, Raine-Bennett T, Wentzensen N, Boyle S. A prospective study of genotyping for the management of HPV-positive, Pap-negative results. EUROGIN 2013
62. Berkhof J, Coupé VM, Bogaards JA, van Kemenade FJ, Helmerhorst TJ, Snijders PJ, et al. The health and economic effects of HPV DNA screening in The Netherlands. *Int J Cancer*. 2010 Nov 1;127(9):2147-58.

63. Huh W, Huang J, Willians E, Bramley T, Poulos N. Evaluating the cost-effectiveness of human papillomavirus (HPV)-based cervical cancer screening strategies, including genotyping for HPV 16/18. *EUROGIN* 2013.
64. Wen X Jin, Lipold L, McKenzie M, Sikon A. Cervical cancer screening: What's new and what's coming?. *Cleve Clin J Med*. 2013 Mar;80(3):153-60
65. Cortés J, Martín-Torres F, Ramon y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M, et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol*. 2010 Jun;53 (1): 1-19
66. HPV today nº24 2011. Edición Especial
67. Louie KS, de Sanjose S, Mayaud P. Epidemiology and prevention of human papillomavirus and cervical cancer in sub-Saharan Africa: A comprehensive review. *Trop Med Int Health*. 2009 Oct;14(10):1287-302.
68. Cronje HS. Cervical screening strategies in resourced and resource-constrained countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011 Oct;25(5):575-84
69. Igdbashian S, Boveri S, Spolti N, Radice D, Sandri MT, Sideri M. Self-collected human papillomavirus testing acceptability: Comparison of two self-sampling modalities. *J Womens Health (Larchmt)*. 2011 Mar;20(3):397-402.
70. Petignat P, Vassilakos P. Is it time to introduce HPV self-sampling for primary cervical cancer screening?. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Feb 8;104(3):166-7

71. Gök M, Heideman DA, van Kemenade FJ, Berkhof J, Rozendaal L, Spruyt JW, et al. HPV testing on self collected cervicovaginal lavage specimens as screening method for women who do not attend cervical screening: cohort study. *BMJ*. 2010 Mar 11;340:c1040
72. Wikström I, Lindell M, Sanner K, Wilander E. Self-sampling and HPV testing or ordinary Pap-smear in women not regularly attending screening: a randomised study. *Br J Cancer*. 2011 Jul 26;105(3):337-9.
73. Gök M, Heideman DA, van Kemenade FJ, de Vries AL, Berkhof J, Rozendaal L, et al. Offering self-sampling for human papillomavirus testing to non-attendees of the cervical screening programme: Characteristics of the responders. *Eur J Cancer*. 2012 Aug;48(12):1799-808.
74. Zhao FH, Lewkowitz AK, Cheng F, Lin MJ, Hu SY, Zhang X, et al. Pooled Analysis of a Self-Sampling HPV DNA Test as a Cervical Cancer Primary Screening Method. *Int J Cancer*. 2012 Dec 15;131(12):2929-38
75. Parra M, Palomares JC, Bernal S, González MT, Sivianes N, Pérez L, et al. Evaluation of the Cobas 4800 CT/NG Test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA in urogenital swabs and urine specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Dec;74(4):338-42.
76. Rockett R, Goire N, Limnios A, Turra M, Higgins G, Lambert SB, et al. Evaluation of the Cobas 4800 CT/NG test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Transm Infect*. 2010 Nov;86(6):470-3

77. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* —. *MMWR* 2014; March 14
78. Rymark P, Forslund O, Hansson BG, Lindholm K. Genital HPV infection not a local but a regional infection: experience from a female teenage group. *Genitourin Med.* 1993 Feb;69(1):18-22
79. Forslund O, Hansson BG, Rymark P, Bjerre B. Human papillomavirus DNA in urine samples compared with that in simultaneously collected urethra and cervix samples. *J Clin Microbiol.* 1993 Aug;31(8):1975-9.
80. Strauss S, Jordens JZ, McBride D, Sonnex C, Edwards S, Desselberger U et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in paired urine and cervical scrapes. *Eur J Epidemiol.* 1999 Jul;15(6):537-43.
81. Sellors JW, Lorincz AT, Mahony JB, Mielzynska I, Lytwyn A, Roth P, et al. Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *CMAJ.* 2000 Sep 5;163(5):513-8.
82. Brinkman JA, Jones WE, Gaffga AM, Sanders JA, Chaturvedi AK, Slavinsky III J, et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Urine Specimens from Human Immunodeficiency Virus-Positive Women. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3155-61
83. Stanczuk GA, Kay P, Allan B, Chirara M, Tswana SA, Bergstrom S, et al. Detection of human papillomavirus in urine and cervical swabs from patients with invasive cervical cancer. *J Med Virol.* 2003 Sep;71(1):110-4

84. Prusty BK, Kumar A, Arora R, Batra S, Das BC. Human papillomavirus (HPV) DNA detection in self-collected urine. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005 Sep;90(3):223-7.
85. Gupta A, Arora R, Gupta S, Prusty BK, Kailash U, Batra S, Das BC. Human papillomavirus DNA in urine samples of women with or without cervical cancer and their male partners compared with simultaneously collected cervical/penile smear or biopsy specimens. *J Clin Virol.* 2006 Nov;37(3):190-4
86. Daponte A, Pournaras S, Mademtzis I, Hadjichristodoulou C, Kostopoulou E, Maniatis AN et al. Evaluation of high-risk human papillomavirus types PCR detection in paired urine and cervical samples of women with abnormal cytology. *J Clin Virol.* 2006 Jul;36(3):189-93.
87. Song ES, Lee HJ, Hwang TS. Clinical Efficacy of Human Papillomavirus DNA Detection in Urine from Patients with Various Cervical Lesions. *J Korean Med Sci.* 2007 Feb;22(1):99-104
88. Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):897-901
89. Alameda F, Bellosillo B, Fuste P, Musset M, Mariñoso ML, Mancebo G, et al. Human papillomavirus detection in urine samples: an alternative screening method. *J Low Genit Tract Dis.* 2007 Jan;11(1):5-7
90. Jong E, Mulder JW, van Gorp EC, Wagenaar JK, Derksen J, Wasterga J, et al. The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired

- urine and cervical smear samples of HIV-infected women. *J. Clin Virol* 2008 Feb;41(2):111-5.
91. Bissett SL, Howell-Jones R, Swift C, De Silva N, Biscornet L, Parry JV, et al. Human papillomavirus genotype detection and viral load in paired genital and urine samples from both females and males. *J Med Virol*. 2011 Oct;83(10):1744-51
92. Cuschieri K, Nandwani R, McGough P, Cook F, Hogg L, Robertson C, et al. Urine testing as a surveillance tool to monitor the impact of HPV immunization programs. *J Med Virol*. 2011 Nov;83(11):1983-7
93. Tanzi E, Bianchi S, Fasolo MM, Frati ER, Mazza F, Martinelli M, et al. High Performance of a New PCR-Based Urine Assay for HPV-DNA Detection and Genotyping. *J Med Virol*. 2013 Jan;85(1):91-8
94. Muñoz M, Camargo M, Soto-De leon S, Sanchez R, Parra D, Pineda A, et al. Human Papillomavirus Detection from human immunodeficiency virus-infected colombian women's. *PLoS One*. 2013;8(2):e56509
95. Jacobson DL, Womack SD, Peralta L, Zenilman JM, Feroli K, Maehr J, et al. Concordance of human papillomavirus in the cervix and urine among inner city adolescents. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Aug;19(8):722-8
96. Mendez K, Romaguera J, Ortiz AP, López M, Steinau M, Unger ER. Urine-based human papillomavirus DNA testing as a screening tool for cervical cancer in high-risk women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014 Feb;124(2):151-5.
97. Sahasrabuddhe V, Gravitt PE, Dunn ST, Brown D, Allen RA, Eby YJ, Smith K, et al. Comparison of Human Papillomavirus Detections in Urine,

- Vulvar, and Cervical Samples from Women Attending a Colposcopy Clinic. *J Clin Virol*. 2014 May 2. pii: S1386-6532(14)00149-8.
98. Franciscatto L, Silva CMD, Barcellos RB, Angeli S, Silva MSN, Almeida SEM, et al. Comparison of urine and self-collected vaginal samples for detecting human papillomavirus DNA in pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2014 Apr;125(1):69-72
99. D'Hauwers KW, Tjalma WA. Screening for human papilloma virus: Is urine useful?. *Indian J Cancer*. 2009 Jul-Sep;46(3):190-3
100. Sehgal S, Gupta A, Parashari P, Sodhani V, Singh. Urine HPV-DNA detection for cervical cancer screening: Prospects and prejudices. *J Obst Gynaecol*. 2009 Oct; 29(7);583-589
101. Vorsters A, Micalessi I, Bileke J, Leven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 May;31(5):627-40
102. Enerly E, Olofsson C, Nygard M. Monitoring human papillomavirus prevalence in urine samples: a review. *Clin Epidemiol*. 2013;5:67-79.

13. PUBLICACIONES RELACIONADAS

- Bernal S, Palomares J.C, Artura A, Parra M, Cabezas JL, Robles A, Martín-Mazuelos E Comparison of urine and cervical samples for detecting human papillomavirus (HPV) with the Cobas 4800 HPV test. Journal of Clinical Virology (In Press Ref No: JVC-D-14-00204).
- Bernal S, Palomares J.C, Artura A, Parra M, Cabezas J.L, Romo J.M, Martín Mazuelos E. Comparison of the Cobas 4800 Human Papillomavirus test against a combination of the Amplicor Human Papillomavirus and the Linear Array tests for detection of HPV types 16 and 18 in cervical samples. Journal of Virological Methods 180 (2012):7–10.
- Parra M, Palomares J.C, Bernal S, González T, Sivianes N, Pérez L, Pueyo I, Martín Mazuelos E. Evaluation of the Cobas 4800 CT/NG Test for detecting *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA in urogenital swabs and urine specimens. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 74 (2012) 338–342
- Bernal S, Cabezas J.L, Pablos C, Palomares J.C, Martín Mazuelos E. Prevalencia de infecciones y tipos de HPV en relación con la edad en el área hospitalaria de Valme (Sevilla). XXII Reunión SAMPAC Jaén 2009.
- Bernal S, Palomares J.C, Parra M, Pablos C, Cabezas J.L, Almeida C, Martín Mazuelos E. Evaluación del Cobas 4800 HPV test para la detección y genotipado simultaneo del virus del papiloma humano en muestras cervicales. XXIII Reunión SAMPAC Málaga 2010.
- Bernal S, Palomares J.C, Macías J, González T, Cabezas J.L, Pablos C, Sivianes N, Pineda J.A, Lozano F, Ferrete C, Gómez Mateos J, Martín Mazuelos E. Prevalencia de infección anal por HPV y coinfección

Chlamydia trachomatis en varones homosexuales VIH positivos. XIV Congreso SEIMC Barcelona 2010.

- Bernal S, Artura A, Parra M, Romo J.M, Cabezas J.L, Almeida C, Martín Mazuelos E, Palomares J.C. Utilidad de la orina para la detección del VPH en mujeres de más de 30 años. XXIV Reunión SAMPAC Sevilla 2011.
- Bernal S, Artura A, Parra M, Romo J.M, Cabezas J.L, Pablos C, Martín Mazuelos E, Palomares J.C. Detección del virus del papiloma humano en muestras de orina. XV Congreso SEIMC Málaga 2011.
- Bernal S, Palomares J.C, Artura A, Parra M, Cabezas J.L, Martín Mazuelos E. Genotipado del virus del papiloma humano en muestras de orina. XVII Congreso SEIMC Zaragoza 2013.
- Bernal S, Parra M, Ortiz De Lejarazu R, Cabezas J.L, Zacariya-Yousef I, Palomares JC, Martín Mazuelos E. Comparación del HPV direct flow chip kit con el Cobas 4800 HPV test para el screening y genotipado del virus del virus del papiloma humano. XVIII Congreso SEIMC Valencia 2014.