

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



57

Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

María Luisa Mateos Lindemann

Autores

María Luisa Mateos Lindemann
Sonia Pérez-Castro
María Teresa Pérez-Gracia
Manuel Rodríguez-Iglesias



ISBN: 978-84-608-7617-5

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Mateos Lindemann ML, Pérez-Castro S, Pérez-Gracia MT, Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. 57. Mateos Lindemann ML (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo "Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org"

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

57. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO. **2016**

Coordinador:

María Luisa Mateos Lindemann¹

Autores:

María Luisa Mateos Lindemann¹
Sonia Pérez-Castro²
María Teresa Pérez-Gracia³
Manuel Rodríguez-Iglesias⁴



¹ Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. ² Servicio de Microbiología. Hospital EOXI de Vigo, Meixoeiro, Pontevedra. ³ Área de Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Moncada. Valencia. ⁴ Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Puerta del Mar, Universidad de Cádiz, Cádiz.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Aspectos virológicos. VPH y oncogenes.....	7
	2.1. Virus del papiloma humano (VPH).....	7
	2.2. Relación entre VPH y cáncer	8
	2.3. Proteínas oncogénicas del VPH.....	9
3.	Historia natural. Formas clínicas de la infección por el VPH.....	12
4.	Transmisión	13
5.	Epidemiología.....	13
6.	Muestras. Recogida y conservación	14
	6.1. Recogida de la muestra.....	14
	6.2. Transporte y conservación de la muestra.....	15
	6.3. Manejo de la muestra en el laboratorio	15
7.	Técnicas comerciales de detección de VPH.....	16
	7.1. Características técnicas.....	16
	7.2. Validación clínica y marcado FDA para su uso en cribado.....	16
	7.3. Comparación de las pruebas disponibles	17
	7.3.1. Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA (Digene)	19
	7.3.2. Cervista HPV HR® (Hologic).....	19
	7.3.3. Cobas® HPV Test (Roche Diagnostics).....	19
	7.3.4. Aptima HPV Assay® (Hologic)	19
	7.4. Calidad.....	20
	7.5. Retos	21
8.	Indicaciones clínicas	21
	8.1. Cribado de cáncer cervical (CCU).....	21
	8.2. Utilización de la prueba de detección del VPH en el cribado de CCU.....	21
	8.3. Algoritmo de cribado basado en el genotipado parcial del VPH	22
9.	Bibliografía.....	24

DOCUMENTO TÉCNICO

1. PNT-VPH-01. Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH).

ABREVIATURAS

ASCUS: células escamosas de significado incierto
ITS: infección de transmisión sexual
VPH: virus del papiloma humano
CCU: cáncer de cuello de útero
CA: cáncer anal
CIN2+: neoplasia cervical intraepitelial grado 2 o lesión más severa
CIN3: neoplasia cervical intraepitelial grado 3
CCO: cáncer de cavidad oral
DPO: *dual priming oligonucleotide*
MSM: hombres que tienen sexo con hombres
NILM: negativo para lesión intraepitelial o malignidad
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PIN: neoplasia epitelial de pene
PRR: papilomatosis respiratoria recurrente
PRUEBA VPH: prueba de laboratorio para detectar la infección por VPH-AR
TMA: transcription mediated amplification
TOCE: *tagging oligonucleotide cleavage & extension*
VIN: neoplasia intraepitelial vaginal
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
VPN: valor predictivo negativo
VPH6: virus de papiloma humano genotipo 6
VPH8: virus de papiloma humano genotipo 8
VPH11: virus de papiloma humano genotipo 11
VPH16: virus de papiloma humano genotipo 16
VPH18: virus de papiloma humano genotipo 18
VPH-AR: virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico
VPH-AR no16,18: genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano distintos al 16 o el 18
VPH-BR: virus de papiloma humano de bajo riesgo oncogénico

1. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN que pertenece a la familia *Papillomaviridae* que origina la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente en todo el mundo. En general se adquiere por vía sexual pero también se puede contraer verticalmente de madre a hijo, por contacto con la mucosa cervical durante el parto, por vía transplacentaria y menos frecuentemente por transmisión horizontal durante la infancia.

En España, la prevalencia de infección por el VPH en mujeres sexualmente activas en la población general alcanza el 14% aunque puede variar según el grupo de edad estudiado y los factores de riesgo asociados. A partir de los 40 años, la cifra es más baja, aproximadamente entre el 5-6%.

El VPH infecta específicamente las células basales del epitelio escamoso del cuello del útero, aprovechando la división celular activa de esta zona para su replicación. En la capa superior del epitelio, se forman los típicos coilocitos, células multinucleadas y células con el núcleo aumentado de tamaño. Estos cambios citopáticos son claramente visibles con la tinción de Giemsa o Papanicolau (citología) en los cepillados cervicales que es la muestra idónea para la detección del virus en relación con la patología cervical que ocasiona.

En la mayoría de los casos, la infección por VPH es asintomática, transitoria y puede pasar desapercibida; en otros, las manifestaciones clínicas son muy diversas y comprenden desde simples verrugas y otros procesos benignos, hasta el desarrollo de neoplasias anogenitales tan severas como el cáncer de cuello de útero (CCU), anal (CA), de pene, vagina e incluso en otros sitios anatómicos distantes como la orofaringe y la cavidad oral (CCO), en general.

Se han identificado más de 100 genotipos de VPH, y se estima que aproximadamente 40 de estos, se pueden encontrar en el área genital y anal. Las manifestaciones benignas, condilomas o verrugas genitales están ocasionados por los genotipos no oncogénicos 6 y 11 (VPH6, VPH11). Estos mismos genotipos son los causantes también de la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR). Esta es una enfermedad infrecuente pero que sin embargo, la recurrencia de papilomas en vías respiratorias puede conducir a la muerte en los niños y adolescentes que la padecen.

En el año 1983, después de muchas dudas y bastante controversia en la comunidad científica, zur Hausen et al., (1983) demostraron la implicación del VPH en la etiopatogenia del CCU implicando concretamente al genotipo 16 (VPH16). Un año más tarde se aisló el genotipo 18 (VPH18) que junto con el VPH16, han confirmado en numerosos estudios que causan el 70% de los CCU en el mundo. Precisamente por su grado de asociación con el CCU, los genotipos del VPH se clasifican en genotipos de "alto riesgo oncogénico" (VPH-AR) que comprenden los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, "probable/posible alto riesgo oncogénico" (VPH-PAR) (68, 26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82)" y "bajo riesgo, no oncogénicos" (VPH-BR) siendo los más frecuentes entre estos últimos, el VPH6 y el VPH11.

El CCU es la tercera neoplasia más frecuente en mujeres en el mundo, con algunas diferencias en la tasa de mortalidad según los países. En África subsahariana la mortalidad alcanza hasta el 22,3% en la población femenina. En España, se estima que cada año se diagnostican 2.511 casos nuevos y se producen unas 848 muertes, es decir, aproximadamente 2 mujeres cada día. Estas cifras son extremadamente altas para una enfermedad totalmente prevenible hoy en día en cualquier país desarrollado.

En las últimas décadas, además del descubrimiento pionero de zur Hausen et al. (1983), se ha acumulado suficiente evidencia científica para asegurar sin ninguna duda que la infección por el VPH es condición imprescindible para que se produzca el CCU, detectándose este virus en la casi totalidad de los casos de CCU y en la mayoría de los casos (70-90%) de las lesiones premalignas. Sin embargo, no todas las infecciones por VPH conducen a CCU, la mayoría de ellas son transitorias y el virus se elimina en menos de dos años. La condición indispensable para el desarrollo de este cáncer es la persistencia del ADN del VPH en la célula infectada, y en esto se basan la mayoría de las pruebas de diagnóstico que se utilizan hoy en día.

Además de la citología o tinción de Papanicolau, marcador subrogado de infección por el VPH, existen en el mercado innumerables pruebas directas para la detección de la presencia del virus en muestras cervicales. La mayoría se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, amplificación de señal o detección de la presencia del ARN mensajero de los oncogenes E6 y E7. Sin embargo, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado únicamente 4 pruebas para su utilización en el cribado del CCU y en la

práctica clínica. Casi todas están automatizadas, son muy reproducibles y tienen una elevada sensibilidad para detectar la presencia del virus en mujeres con lesiones premalignas. Por todo ello, hay acuerdo entre los expertos de que la prueba de detección del VPH debe usarse como prueba inicial o "de primera línea" en el cribado del CCU en sustitución de la citología o tinción de Papanicolau, tradicionalmente utilizada hasta ahora con este fin pero que ha mostrado ser poco sensible y muy subjetiva comparativamente. Asimismo, considerando que los genotipos VPH16 y VPH18 causan el 70% de los CCU, todos los esfuerzos se han dirigido tanto a la prevención primaria de estos genotipos concretos (vacunas bi o cuadrivalentes añadiendo los VPH6 y VPH11) como a su detección con el genotipado selectivo o parcial (identificación individualizada de VPH16 y VPH18, además de otros VPH-AR), aconsejado en el cribado poblacional.

Por otra parte, el VPH no solo origina una morbilidad y mortalidad alta en mujeres sino que los procesos malignos asociados a este virus están aumentando en estos últimos años también en hombres, principalmente el cáncer anal, cáncer de pene y cáncer de la cavidad oral. Así, los cánceres localizados en zonas genitales han aumentado su tasa anual en, aproximadamente, un 3% y los de la cavidad oral en un 1%, alcanzando estos últimos una incidencia de 6,2 y 1,4 por 100.000, en hombres y mujeres, respectivamente. Estas cifras pueden ser más altas en individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hombres que tienen sexo con hombres (MSM) e inmunodeprimidos, en general. Igualmente, el VPH16 es el genotipo prevalente tanto en el CA como en el CCO. Los mismos criterios de cribado y vacunación aprobados para el CCU sirven también para el CA aunque este terreno está menos estudiado, y todavía no hay algoritmos validados para comprobar su eficacia.

En la infección por el VPH también hay otros factores que conviene considerar. Existe un reconocimiento inadecuado del impacto social en las sucesivas etapas de la vida de las infecciones por el VPH: los recién nacidos que contraen los tipos de VPH de bajo riesgo 6 y 11 pueden desarrollar la PRR; los adolescentes con infecciones benignas, son altamente contagiosos; en la mediana edad hay consecuencias importantes sobre la capacidad reproductiva y el bienestar de la madre, así como en las personas de edad avanzada que tienen un mayor riesgo de cáncer. De los principales tipos de cáncer en la mujer, el CCU produce una reducción en los años de esperanza de vida, estimada en 29 años, considerablemente mayor que para las

mujeres que mueren por cáncer de mama. Esta situación provoca una importante y evitable carga para las familias jóvenes y, en un grado muy grave, afectan a los niños que pierden a su madre. Sin embargo, la trascendencia de estos hechos no ha sido suficientemente divulgada en el discurso social. La trivialización del tema con la participación de los medios de difusión ha marginado la necesidad de una discusión clara y responsable acerca de la salud sexual y el impacto de esta ITS en la sociedad. La realidad biológica es que la exposición a la infección y reinfección frecuente con los tipos de VPH mucosotrópicos en jóvenes pueden tener consecuencias graves en la salud a largo plazo. El presente documento pretende ser una puesta al día de los cuadros clínicos más frecuentes originados por el VPH y sobre todo, dar información suficiente para elegir el método más adecuado de diagnóstico que se debe utilizar en la práctica clínica diaria y su utilidad junto con otras pruebas de triaje, en los algoritmos de cribado de CCU y CA.

2. ASPECTOS VIROLÓGICOS. VPH Y ONCOGENES

2.1. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, y son virus que generalmente infectan la piel y las mucosas. Se han clasificado en VPH-AR y VPH-BR según su capacidad oncogénica. Los VPH-BR únicamente ocasionan las verrugas y condilomas genitales y otras patologías benignas de piel y mucosas y la asociación con el CCU es bastante infrecuente por lo que, desde el punto de vista clínico y de cribado, únicamente se deben detectar los VPH-AR.

El grupo de VPH-AR comprende los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 (Tabla 1). El genotipo 68 se considera de "probable" riesgo oncogénico y el genotipo 66 previamente era considerado de alto riesgo y por esta razón, están incluidos en muchas de las pruebas de detección del ADN del VPH (prueba VPH) disponibles en el mercado.

Los VPH son virus pequeños, de aproximadamente 50-55 nm de diámetro, sin envoltura y con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros. Su genoma está constituido por ADN circular, de doble cadena, covalentemente cerrado, de un tamaño de 7500-8000 pb. Este ADN se divide en: 1) una región E, de expresión temprana que codifica diversas proteínas estructurales (E1-E7); 2) una región L, de expresión tardía

Tabla 1. Clasificación de los genotipos del VPH según su capacidad oncogénica.
(Modificado de Bouvard V, *et al*, 2009).

GÉNERO	GENOTIPOS VPH	COMENTARIOS
<i>Alfapapillomavirus</i>		
1	16	Altamente oncogénico, causa cáncer en varios lugares anatómicos
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Evidencia suficiente de cáncer cervical
2A	68	Evidencia fuerte de cáncer cervical
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Evidencia limitada de cáncer cervical
2B	30, 34, 69, 85, 97	Análogos filogenéticamente a genotipos con evidencia suficiente o limitada
3	6, 11	-
<i>Betapapillomavirus</i>		
2B	5, 8	Evidencia limitada para cáncer de piel en pacientes con epidermodisplasia verruciforme
3	Otros tipos	

que codifica las proteínas de la cápside (L1 y L2); y 3) una región reguladora, no codificadora (RNC/LCR), situada en dirección 5'. La región temprana (E) representa un 50% del genoma, la tardía (L) un 40% y la región reguladora (RNC/LCR), un 10%.

2.2. RELACIÓN ENTRE VPH Y CÁNCER

Está demostrado que en la mayoría de los casos la infección por el VPH es una condición necesaria, si bien no única, para el desarrollo de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y del cáncer. La CIN puede ser de bajo grado (CIN1), moderada (CIN2) y de alto grado (CIN3). La asociación entre el VPH y la CIN se basa en varios puntos: 1) El virus se detecta en más del 97% de las CIN y carcinomas invasivos, principalmente los genotipos 16, 18, 31 y 45; 2) la infección por el VPH tiene el mayor riesgo relativo para desarrollar lesiones premalignas, comparado con otros posibles factores de riesgo asociados; 3) la progresión de la lesión está relacionada con el tipo de VPH presente en la lesión; 4) el desarrollo de un CIN de grado 3 (CIN3) está muy relacionado con la existencia anterior a dos años de una infección cervical crónica por VPH16 o VPH18; y 5) existe asociación entre VPH y carcinomas de vulva, vagina, pene, ano y, en menor frecuencia, carcinomas de la cavidad oral, laringe, esófago y tracto respiratorio.

La integración del ADN del VPH en el cromosoma de la célula huésped está asociada con la progresión de CIN de alto grado (CIN3) a cáncer. La integración aparece en la mayoría de los carcinomas invasivos pero es rara en lesiones premalignas y benignas. En la misma célula pueden coexistir formas integradas y episómicas. Los puntos de inserción para la integración vírica en el genoma del huésped son múltiples y pueden afectar a distintos cromosomas en proximidad a oncogenes celulares. El lugar de integración del genoma vírico está característicamente situado entre el final 3' de E1 y el 5' de E2, dando como resultado la ruptura, pérdida o inactivación del ORF de E2 y la función de regulación de la replicación vírica que ejerce la proteína E2 sobre otras proteínas del virus. La integración puede también afectar a los genes E1, E4, E5, L1 y L2 pero nunca afecta a E6 y E7. La integración vírica no siempre es necesaria para la transformación maligna, así, algunas infecciones producidas por el VPH de bajo riesgo se han asociado a carcinoma de células escamosas, y en ellas el virus, manteniéndose episómico, había sufrido deleciones, mutaciones y amplificaciones en su genoma.

Se han identificado también otros factores endógenos asociados a la transformación maligna. Los oncogenes celulares *c-myc* y *c-ras* se pueden activar por la integración del ADN vírico en su proximidad. Esto es

significativo, puesto que E7 puede cooperar en la activación de *c-ras* e inducir una transformación celular *in vitro*. La metilación puede también alterar la función de los genes celulares y víricos. También se han detectado anomalías genéticas en carcinomas cervicales afectando al cromosoma 1, y pérdidas alélicas en el brazo corto de los cromosomas 3 y 17 y en el largo del cromosoma 11. Los genes supresores, como *p53*, pueden estar deletados en el cromosoma 17 y las proteínas E6 y E7 pueden inducir anomalías cromosómicas *in vitro*. Algunos trabajos han asociado haplotipos HLA-DQ con cáncer cervical sugiriendo un posible papel de factores inmunogenéticos.

Asimismo, se ha comprobado que existen numerosos factores exógenos que juegan un papel cooperador en la transformación maligna relacionada con el VPH. Entre ellos se incluyen las radiaciones X y UV, el tabaco, las hormonas esteroideas, las vitaminas A y D, los retinoides, los factores de crecimiento como el beta-TGF, los factores de crecimiento epidérmico y derivado de las plaquetas, citoquinas como el TNF y los interferones alfa y gamma, y virus tales como VIH y los herpesvirus.

2.3. PROTEÍNAS ONCOGÉNICAS DEL VPH

Las proteínas E1 y E2 están implicadas en la replicación vírica, formando un complejo esencial como activador transcripcional del genoma vírico. E1 también contribuye al mantenimiento del virus en forma episómica y puede estar ausente cuando el ADN vírico permanece integrado. Los estudios con VPH16 han demostrado la función de E2 como regulador de la transcripción y represor de la expresión de E6 y E7, al unirse el promotor de E6 a la unión proximal de E2 (figura 1). En contraste, la integración vírica fragmenta al gen E2 y permite la transactivación sin control del promotor E6/E7 mediante otros factores de transcripción como TFIID y Spl, induciendo cambios de diferenciación y proliferación celular, con expresión de CD44 en la membrana celular.

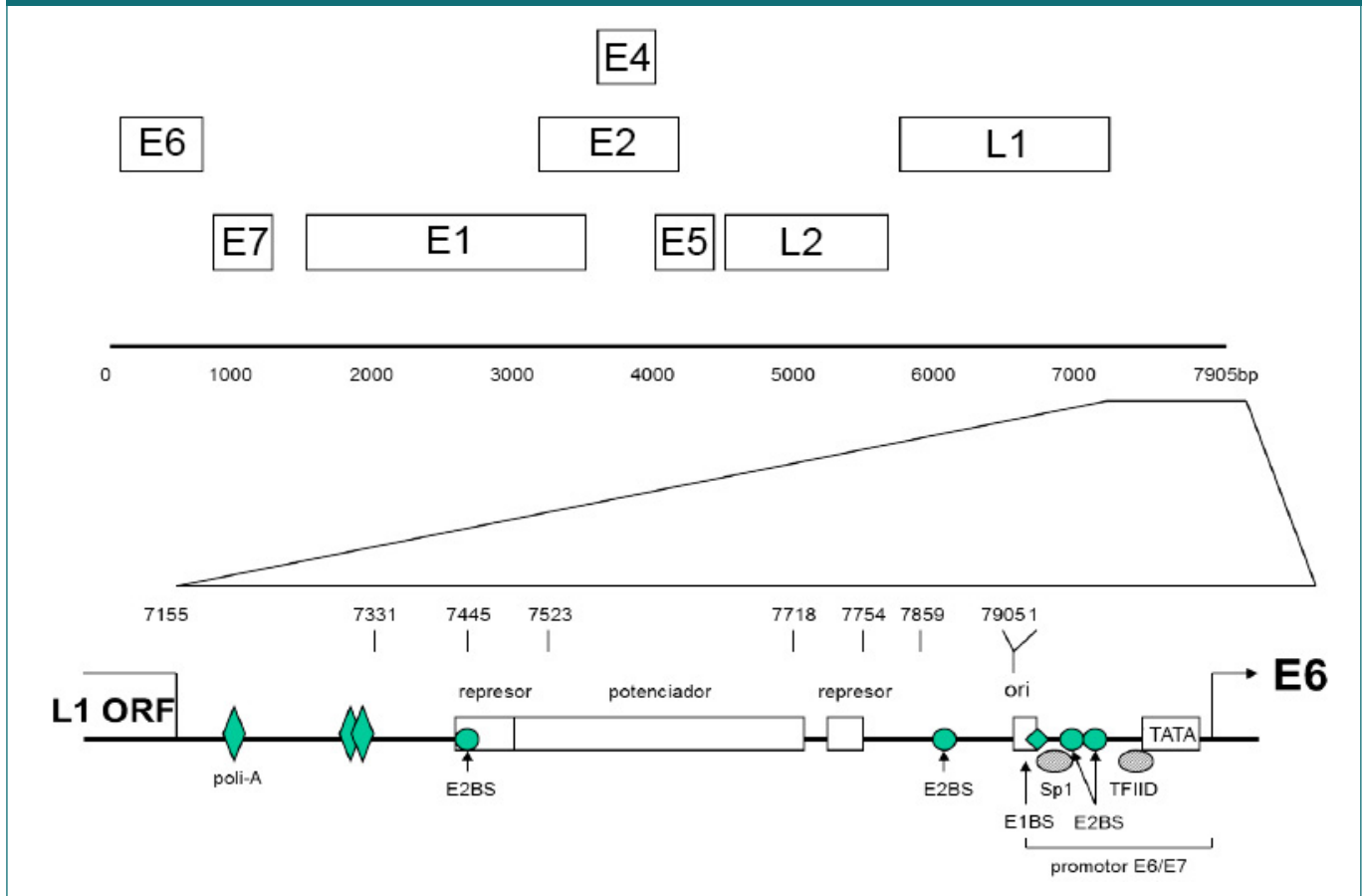
La proteína E5 está unida a la membrana y participa en la transformación maligna de la célula. Sin embargo, su participación no es imprescindible, ya que a menudo el gen E5 se encuentra deletado en células de cáncer de cérvix. Participa en el proceso de tumorigénesis interactuando con receptores de factores de crecimiento celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, en el caso de VPH-6, también con *erbB2* y el receptor del factor de crecimiento de las plaquetas (figura 2), interfiriendo en el

proceso de endocitosis e inactivación de estos receptores. E5 también se une a una porina que participa en la bomba de protones endosómica, y su inactivación conduce a la inhibición en la acidificación del endosoma, incrementando la vida media del receptor EGF y favoreciendo la acción funcional del EGF de activación de los oncogenes *c-fos* y *c-jun*.

Las proteínas E6 y E7 juegan un papel central en la transformación maligna. Ambas se unen a factores celulares con diferente afinidad según el genotipo vírico, lo que permite distinguir entre proteínas con alta capacidad oncogénica (VPH-AR) de otras con escaso o nulo poder transformante (VPH-BR).

E6 es una proteína que se fija al ADN bicatenario. En combinación con una proteína asociada, la ubiquitinligasa, (E6-AP) se une a *p53*, una proteína muy importante en la regulación del ciclo celular y que se acumula en el núcleo durante la fase G1 del ciclo celular. Esta proteína detecta el ADN dañado y activa una serie de genes que inhibirán el progreso del ciclo celular o estimularán la apoptosis. La proteína *p53* es degradada por el complejo E6-AP mediante mecanismos ligados a la ubiquitina. En las células eucariotas existen dos mecanismos de proteólisis: uno es a través de la función del lisosoma, que está reservado para las proteínas que han entrado en la célula mediante endocitosis o pinocitosis, mientras que el otro mecanismo degrada proteínas endógenas mediante la participación del proteosoma que destruye aquellas proteínas marcadas previamente con ubiquitina. Aunque la ruta “ubiquitina-proteosoma” fue inicialmente descrita como una forma de eliminar proteínas defectuosas y no funcionales, actualmente se ha comprobado que constituye un mecanismo crucial como regulador celular al degradar proteínas como ciclinas, *p53*, *c-jun* y *c-fos*, participando en muchos procesos celulares, incluyendo la progresión del ciclo celular, la regulación transcripcional y la presentación de antígeno. De forma resumida consiste en una reacción en cadena en la que, tras la activación de la ubiquitina por la acción de la enzima E1, se une mediante una enzima conjugante (E2 o UBC) con la proteína diana, que a su vez está unida a la ligasa ubiquitina-proteína (E3) y este complejo es reconocido por el proteosoma y conduce a la proteólisis. La E6-AP ligada a la oncoproteína E6 de VPH y a *p53* funciona como una enzima E3 y facilita la degradación de la proteína diana, *p53* en este caso, por el proteosoma. La *p53* contribuye a detener el ciclo celular en fase G1, transactivando el gen *WAF1/CIP1*, cuya proteína *p21* interactúa directamente con el complejo ciclina/kina-

Figura 1. Organización genómica del VPH16 y de su segmento regulador (URR). El URR comienza después del codon de parada del ORF de L1 y termina antes del inicio del ORF de E6. La unión de E2 en ciertos lugares (E2BS) provoca la represión de E6/E7, siendo contrarrestado por otros factores de transcripción como Sp1 y TFIID.



sa dependiente de ciclinas (CDK)/antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), responsable de la fosforilación e inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRB) (figura 3).

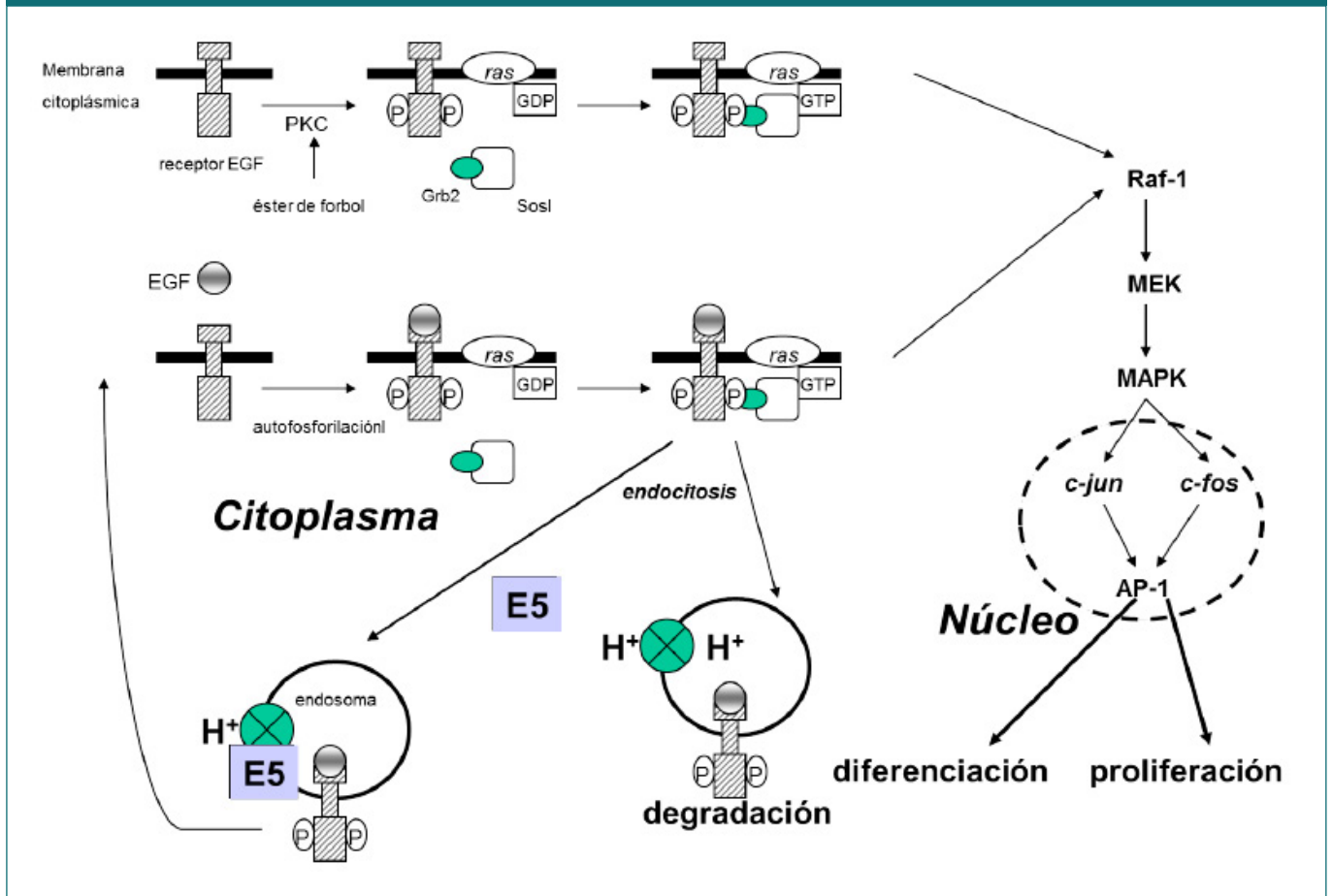
La inactivación de p53 no es el único mecanismo de carcinogénesis inducido por E6. Se ha observado que la presencia de E6 disminuye la capacidad de unión de p53 al ADN mediante mecanismos similares al utilizado por otras proteínas víricas oncogénicas, como la E1A de adenovirus y el antígeno T del virus SV40. Este proceso está relacionado con su capacidad de unión al factor de transcripción CBP/p300 impidiendo su acetilación, estado activo en el que interactúa con p53 y promueve un mecanismo suplementario de inactivación de p53 que no implica su degradación.

En cultivos celulares se ha comprobado la capacidad de E6 para inducir inestabilidad genómica, incluyendo

aneuploidía y amplificación. También se ha comprobado que E6 puede unirse a la proteína c-Myc produciéndose una activación de la telomerasa transcriptasa inversa (hTERT). Esta enzima restaura los telómeros contribuyendo a la inmortalización de la célula.

La proteína E6 puede también unirse a una proteína ligada al calcio, la reticulocalbina 2, (E6-BP), asociada a fenómenos de apoptosis y diferenciación celular. E6 puede comportarse también como un regulador de la transcripción, y coopera, junto al oncogen *ras* activado, en la transformación de células de roedores primarias. La transformación de cultivos celulares infectados por mutantes víricos incapaces de degradar p53 ha demostrado que existen mecanismos alternativos capaces de malignizar la célula, por la activación de diversos factores de transcripción celulares (paxilina, AP-1, hDLG, IRF-3, Myc, hMCM7, Bak y E6TP-1) y la activación de la telomerasa. El factor de transcripción Brn-3a se expresa específicamente en

Figura 2. La activación del receptor EGF por la acción experimental del éster de forbol o por la unión con su ligando, conduce a la activación en cascada de kinasas que inducen la expresión de Ap-1 y la síntesis de las proteínas proto-oncogénicas jun y fos, dando como resultado la diferenciación y proliferación de la célula. Este proceso se controla por la endocitosis del receptor EGF, en donde es degradado por las condiciones ácidas del endosoma. La acidificación del endosoma depende de la actividad de una bomba de protones que puede ser bloqueada por la acción de la proteína E5..



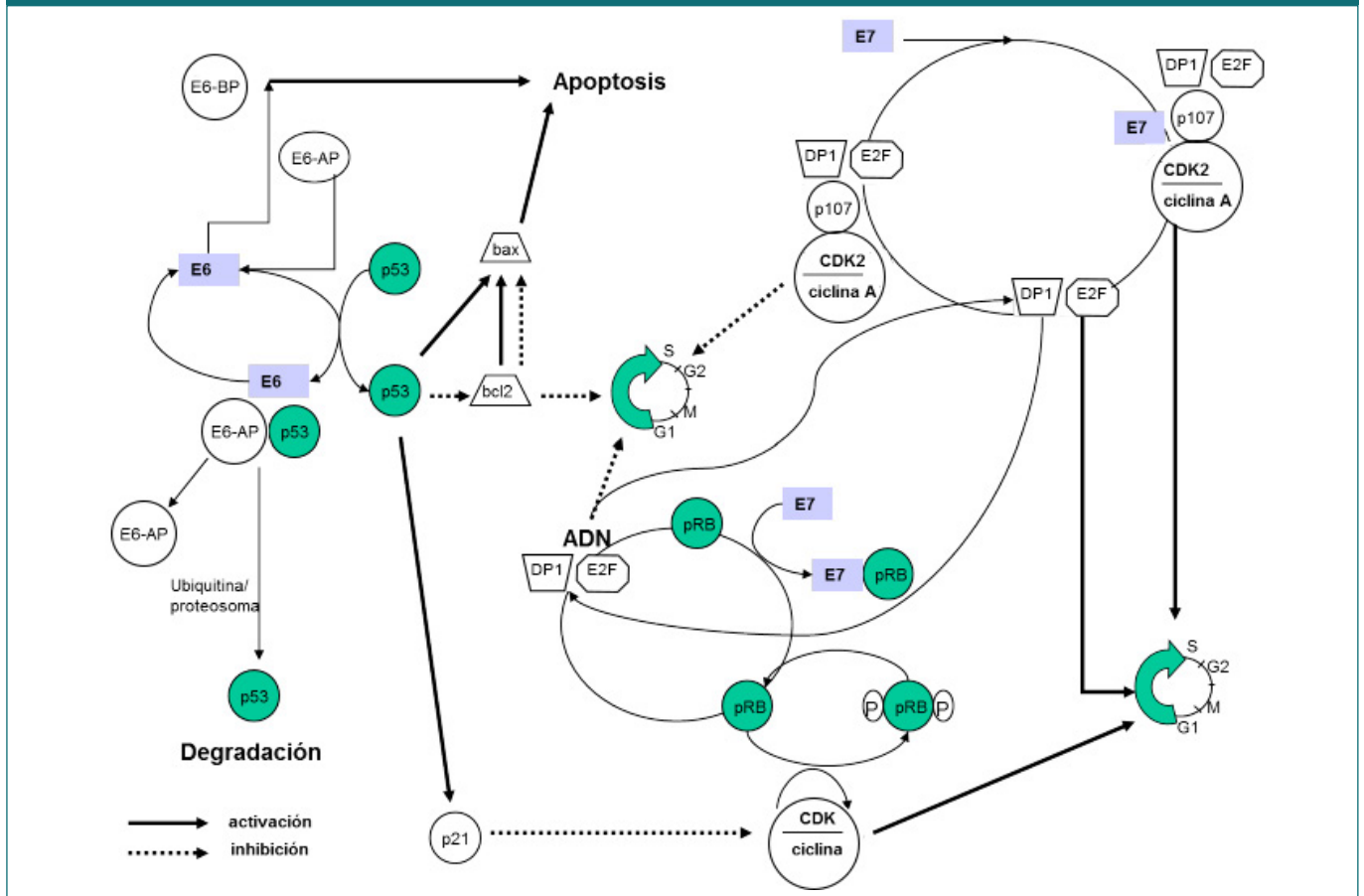
células cervicales y neuronales, estando muy aumentado en las células malignizadas por VPH, debido a que actúa sobre la transcripción del virus en la región URR.

La proteína E7 altera la funcionalidad de la pRB (proteína del retinoblastoma), un producto del gen supresor de tumores Rb-1, que al unirse al factor de transcripción EF-2 y su proteína asociada DP-1 frena el ciclo celular en la fase G1. La unión E7-pRB modifica e inactiva su función de control del ciclo celular colaborando en la transformación. También E7 puede unirse a las proteínas p107 y p130, con funciones similares a la pRB, provocando la misma acción. Del mismo modo que E6, E7 tiene actividad reguladora de la transcripción del oncogen *ras* en cultivos celulares y en animales transgénicos (figura 3).

La obtención de ratones transgénicos que expresan por separado las proteínas E6 y E7 ha permitido estudiar los efectos aislados de éstas sobre la carcinogénesis, observándose que E7 induce tumores benignos, al contrario que E6, que produce la transformación maligna de la célula. La carcinogénesis es un proceso complejo con múltiples efectos sobre el genoma y que requiere la inducción del tumor benigno y una serie de efectos en cascada que conducen a la malignización.

La detección de formas episómicas del VPH causantes de carcinoma de cérvix ha estimulado el estudio de otros factores que no impliquen la integración del virus en el cromosoma de la célula. Así, se ha demostrado que mutaciones en el lugar de fijación del factor de transcripción YY del segmento URR conducen a la progresión del cáncer cervical.

Figura 3. Modelo de interacciones biológicas de las proteínas E6 y E7 de VPH-AR .



3. HISTORIA NATURAL. FORMAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EL VPH

El VPH es un patógeno que forma parte de la condición humana, está bien adaptado a infectar el epitelio y es tan frecuente como para ser casi inevitable su relación con el hospedador. A diferencia de los virus que establecen enfermedades graves agudas poco después de la infección, el modelo de las infecciones por VPH es principalmente latente, subclínica y oportunista, con una reproducción y transmisión esporádica, encontrándose generalmente en un estado ecológico de equilibrio con el hospedador. Es inevitable reconocer la extraordinaria prevalencia y lo inevitable de la infección y sobre todo, su importancia como un precursor de cáncer que permite que intervenciones preventivas contra su infección resulten en la reducción razonable y posible de ciertos tipos de tumores que afectan a la humanidad.

En las mujeres, la infección por el VPH se ha asociado principalmente a CCU, cáncer de vagina y de vulva.

En muchos países industrializados la prevalencia de las infecciones por VPH en mujeres adultas jóvenes es tan alta como del 40 al 80% y la probabilidad de infectarse a lo largo de la vida de un 80-90%. La mayoría de estas infecciones desaparecen espontáneamente sin signos o síntomas clínicos. Las nuevas infecciones que aparecen a cualquier edad son benignas a menos que persista el virus. La historia natural de la infección por el VPH y los primeros pasos de la carcinogénesis cervical son bien conocidos por estudios prospectivos. El CCU es la etapa final poco frecuente de una infección en el cérvix no resuelta por el VPH, en la que persiste el ADN del VPH en muestras cervicales. Esta persistencia (más de dos años) en el cérvix es el evento necesario para el desarrollo de CCU. La fracción de portadores persistentes de VPH en la edad media se estima en un rango del 4 al 10% y estas mujeres son el verdadero grupo de alto riesgo para el CCU y probablemente para cualquier otro tipo de cáncer relacionado con el VPH. Los factores endógenos y exógenos subyacentes que impulsan el proceso de persistencia de la infección aún no están claros. El tiempo

que transcurre entre la infección por el VPH y la incidencia de cáncer es de dos a cuatro décadas, por lo que el inicio de la infección y las lesiones precursoras del CCU son un objetivo apropiado para el cribado y la detección temprana.

En cuanto a los cánceres de la vagina y sus lesiones precursoras, el ADN del VPH se detecta en la mayoría de los casos. Entre el 60% y el 90% de los casos de cáncer vaginal y entre el 82% y el 100% de las lesiones vaginales catalogadas como neoplasia intraepitelial (VIN) de grado 3 son VPH-ADN positivo.

Igualmente se ha encontrado también ADN del VPH en los cánceres de la vulva, aunque la asociación de la infección por VPH con estos es menor, alrededor de un 40-50%.

En los hombres, a pesar de que la neoplasia intraepitelial del pene (PIN) es poco conocida, los datos revelan la participación del VPH aunque la persistencia es menos probable, el ADN del VPH se encuentra solamente en un tercio de los casos de cáncer de pene y en el 87,1% de las lesiones de alto grado.

El CA es una patología que se puede considerar emergente desde que se asoció a la infección por el VPH. Incide preferentemente en varones homosexuales pero también en mujeres infectadas en el cérvix. En ambos sexos, el ADN del VPH se detecta en el cáncer anal (88-94%).

Por último, entre las patologías malignas asociadas al VPH se encuentran los CCO. En ellos, la prevalencia de ADN del VPH varía mucho según los diferentes estudios, la localización anatómica del tumor y la geografía, debido a factores exógenos y culturales propios. En el cáncer de orofaringe, el ADN de VPH se ha encontrado entre el 35 y el 50% en pacientes en los países desarrollados, en contraste con el resto de la cavidad oral, donde el ADN de VPH se encuentra en el 5 al 15% de los casos. También se ha confirmado la expresión del ARNm de E6/E7 y la integración del genoma vírico y los modelos experimentales han mostrado la expresión de las proteínas oncogénicas E6/E7 como necesarias para la iniciación y mantenimiento del fenotipo maligno de estos cánceres.

Asimismo, la infección por el VPH está asociada causalmente con enfermedades benignas como las verrugas, condilomas genitales y patología de las vías aéreas superiores como la PRR. Los tipos de VPH-BR 6 y 11 son la causa de ambos cuadros clínicos. La PPR

se caracteriza por el crecimiento de múltiples papilomas, habitualmente en la región laríngea. La PRR puede manifestarse en la infancia temprana, con un inicio juvenil, o en la edad adulta y es una enfermedad poco frecuente. El factor de riesgo más importante para la PRR juvenil es una historia materna de verrugas genitales en el embarazo, mientras que para la PRR adulto, lo son el número de parejas sexuales a lo largo de su vida y el sexo genital oral. Se han evaluado muchas terapias para la PRR, con un éxito limitado y, a menudo, con efectos secundarios graves. Puede ser que la terapia más eficaz a largo plazo sea la que estimula una respuesta inmune eficaz y persistente mediante la vacunación.

4. TRANSMISIÓN

El VPH es un agente responsable de una enfermedad altamente contagiosa que afecta a la especie humana debido a su comportamiento sociable. Los datos de los que se dispone actualmente indican que la transmisión del VPH entre parejas heterosexuales es extremadamente común, principalmente por contacto con la piel de la zona genital pero también puede transmitirse por contacto con mucosas y fluidos biológicos. Se ha descrito algún caso de infección por compartir objetos sexuales.

También es común en la mujer la autoinoculación entre las regiones genitales y anales. Los estudios demuestran que las infecciones por VPH en la región anal en mujeres y en MSM son muy frecuentes, sobre todo en personas infectadas por el VIH. Del mismo modo, el aclaramiento del VPH anal es también común y pocos individuos muestran persistencia, a menos que estén infectadas por el VIH. Este es un factor que influye en gran medida en el desarrollo del estadio precursor del cáncer invasor anal.

Al igual que lo que ocurre con la prevalencia del VPH genital, tener un alto número de parejas sexuales aumenta el riesgo de adquisición de infecciones por el VPH. Otros factores de riesgo son no utilizar protección en el acto sexual, aunque se ha comprobado que utilizar preservativo no protege al 100%, las relaciones entre MSM y tener una disminución de la inmunidad.

5. EPIDEMIOLOGIA

La prevalencia global de la infección por el VPH en mujeres con citología normal es de alrededor del

11-12%, con las cifras mayores en África subsahariana (24%), Europa del Este (21%) y América Latina (16%). Las tasas máximas de prevalencia del VPH se observan en mujeres menores de 25 años con una disminución en las edades más avanzadas en muchas poblaciones, aunque algunas de las cuales tienen un repunte secundario en la peri-menopausia temprana o en las mujeres menopáusicas. En otras poblaciones, como en China, la prevalencia de VPH es relativamente independiente de la edad. La explicación de la diferencia en estos patrones de prevalencia y la importancia clínica no se comprende con certeza. Los cinco tipos de virus más frecuentes en todo el mundo son VPH16 (3,2%), VPH18 (1,4%), VPH52 (0,9%), VPH31 (0,8%) y VPH58 (0,7%), aunque estas estimaciones representan la prevalencia puntual y no acumulativa a la exposición y pueden estar subestimadas. En un estudio reciente se demuestra que aproximadamente el 85% de las lesiones CIN3, más del 70% de las CIN2 y la mitad las lesiones CIN1 están asociadas a infecciones por los tipos VPH6/11/16/18/31/33/45/52/58, de lo que se deduce que una vacuna nonavalente protegería de la mayoría de las infecciones oncogénicas.

La prevalencia aumenta en mujeres con patología cervical en proporción directa con el nivel de evolución de la lesión determinada por citología, alcanzando alrededor del 90% en mujeres con CIN3 y CCU. Las investigaciones retrospectivas han demostrado que en casi el 100% de todos los CCU se encuentra el VPH.

El CCU es el cuarto cáncer más común en las mujeres, y el séptimo en la prevalencia general, con una estimación de 528.000 nuevos casos en 2012 y de 609.000 para 2020. Al igual que con el cáncer de hígado, una gran mayoría (alrededor del 85%) de los casos se producen en las regiones menos desarrolladas, donde representa casi el 12% de todos los cánceres que afectan a la mujer. Las regiones de alto riesgo, con una tasa estandarizada por edad superior a 30 por 100.000, incluyen el este de África (42,7%), Melanesia (33,3%), sur de África (31,5%) y África central (30,6%). Los índices más bajos están en Australia/Nueva Zelanda (5,5%) y en Asia occidental (4,4%).

En España, en 2012 hubo 2.511 nuevos casos y las estimaciones para 2020 son de 2.710, y en cuanto a la mortalidad, en 2010 se produjeron 848 muertes, estimándose que en 2020 se producirán 949.

6. MUESTRAS. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN

6.1. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La muestra adecuada para la detección del VPH es el cepillado o la biopsia, dependiendo de la localización, recogidas habitualmente en medio líquido, en recipientes estériles de cierre hermético.

Los cepillos utilizados para la obtención de las muestras serán estériles y de material inerte y nunca de algodón ni con vástago de madera, pues son materiales naturales que podrían inhibir la PCR. También hay que recordar que deben rechazarse las muestras con más de un 2% v/v de sangre.

El cepillado endocervical se tomará con un cepillo específicamente diseñado para la recolección de células del canal endocervical (cepillo endocervical o citobrush). Se introduce en las dos terceras partes del canal endocervical y se rota suavemente entre 90 y 180 grados o 5 veces en el sentido de las agujas del reloj. Se evitarán tomas de muestra con sangre dado que la hemoglobina puede inhibir la PCR. De forma genérica, tras cualquier cepillado, debe introducirse el cepillo en un medio de transporte líquido. Si el cepillo se puede cortar fácilmente o si desprende el cabezal, se dejará en su interior. En otro caso, se frotará unas 10 veces contra el fondo del vial con el medio de transporte y se desechará.

Para la aceptación o rechazo de las muestras endocervicales, hay que tener en cuenta el protocolo de cribado de CCU vigente en cada Comunidad Autónoma. Este es un aspecto muy controvertido dado que la intensa investigación en este campo hace que se vayan publicando de forma secuencial protocolos y recomendaciones diferentes de las diversas sociedades científicas. En general, deben rechazarse muestras de control recibidas de pacientes a las que se ha realizado la determinación en los 12 meses previos y no hay evidencia de lesiones cervicales.

La muestra de orina en la mujer, aunque es muy fácil de tomar, ha mostrado una sensibilidad inferior y por esto no se recomienda para el cribado de CCU.

El cepillado anal, tanto en mujeres como en hombres, se realizará de varias zonas tomadas al azar. Para la toma de muestra genitourinaria para detección del VPH en el varón, la localización elegida de la toma de muestra marcará la sensibilidad. Aunque se pueden utilizar

cepillados, orina y semen, algunos autores defienden la triple toma en glande, surco coronario y uretra distal (introduciendo los tres cepillos en un mismo vial).

También pueden recogerse cepillados de otras localizaciones para detectar la presencia del VPH pero no se ha establecido el valor predictivo positivo o negativo de tales determinaciones, tales como el cepillado de amígdalas, interior de la boca y bordes de la lengua en el caso del diagnóstico de infección oral. Ciertos autores han descrito el uso de enjuagues bucales con soluciones antisépticas comerciales. Debe aclararse que la detección del VPH en la cavidad oral no debe utilizarse como cribado de cáncer orofaríngeo. Para éste, la biopsia extraída en el momento del tratamiento quirúrgico de la lesión es la muestra adecuada y hay que señalar que es especialmente útil. Dado que el pronóstico es diferente según se detecte o no el VPH, el resultado de la prueba ayudará a decidir la duración y dosis del tratamiento quimio y radioterápico mas adecuado.

En ciertos contextos clínicos podría ser útil la biopsia de verrugas (por ejemplo, verrugas resistentes al tratamiento tópico o de lesiones verrugosas de dudosa etiología y que precisan extracción quirúrgica). Se enviarán en un bote estéril sobre una gasa con un fondo de solución salina en condiciones asépticas. Debe evitarse el formol puesto que podría inhibir la PCR. En caso de que sean biopsias parafinadas, podrán extraerse tras desparafinado con una solución indicada para tal uso.

Debe tenerse en cuenta que el genotipo del VPH que se detecte en cualquier localización es una aproximación al genotipo que esté causando la lesión, puesto que puede haber otros en otra localización o incluso varios en infecciones mixtas. Sin embargo se recomendará siempre la toma de muestra menos invasiva que haya demostrado un valor pronóstico adecuado. Habitualmente se recomienda la utilización de los medios líquidos (medios de citología líquida) en los que se ha evaluado cada técnica comercial y que en ciertas ocasiones son los únicos viales reconocidos por los aparatos automáticos de extracción/PCR. El de uso más extendido es el Thin Prep® PreservCyt® Solution (Hologic Inc., Marlborough, MA, EUA). El BD SurePath™ (BD Diagnostics) es otro medio de citología líquida que, a diferencia del anterior, contiene formalina. Esto promueve la unión del ADN del VPH a las proteínas, lo que puede provocar una fragmentación de dicho ADN interfiriendo con su amplificación y por lo tanto reduciendo la sensibilidad analítica. Como

consecuencia, debe realizarse un pretratamiento de las muestras enviadas en el SurePath™ antes de la detección del VPH.

En las especificaciones de algunas técnicas se admite el uso de torunda sin medio.

Se podrían utilizar otros medios líquidos adecuados para PCR como buffer TE pH 8,0 (grado biología molecular). Aunque no existen muchos estudios que hayan comparado el efecto de la utilización de diversos medios de transporte líquidos, ciertos autores han concluido que el resultado no se influye por los medios de transporte sino por la sensibilidad analítica de las pruebas utilizadas.

6.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Previamente a la toma de la muestra, los viales de citología líquida se mantendrán a temperatura ambiente. Las muestras se cerrarán herméticamente, se etiquetarán con el nombre de paciente y se acompañarán de una petición con datos clínicos. El transporte de las muestras debe realizarse lo antes posible al laboratorio de Microbiología a temperatura ambiente.

6.3. MANEJO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

Dado que no es una determinación urgente, las muestras se procesarán en grupos de mayor o menor tamaño según el sistema a utilizar. Sin embargo, el ADN y sobre todo el ARNm pueden degradarse tras repetidos ciclos de congelación y descongelación, por lo que siempre se recomienda no congelar, mantener la muestra en nevera y demorar lo menos posible su procesamiento. De forma general los medios de transporte se deben mantener un máximo de 4-6 semanas a temperatura ambiente (15-30°C) antes de su procesamiento. Los extraídos de ácidos nucleicos se deben mantener a -20°C.

Las biopsias se machacarán para su posterior extracción de ácido nucleico y se congelarán a -20°C.

Alguna muestra muy mucosa puede dar problemas de pipeteo durante la extracción. Se pueden homogeneizar previamente con ayuda de bolitas de vidrio estériles y con agitación con vórtex previo a la extracción. Deben tomarse las precauciones necesarias dado que se podrían formar gotitas que, según la sensibilidad de la técnica, podrían dar lugar a contaminaciones.

Una adecuada carga de trabajo, entrenamiento del personal y frecuencia en la determinación de PCR darán mayor fiabilidad a los resultados.

7. TÉCNICAS COMERCIALES DE DETECCIÓN DEL VPH

Existen en el mercado más de 125 técnicas comercializadas para la detección del VPH con más de 84 variantes de las mismas y se incrementa anualmente la oferta en aproximadamente un 20%. Se trata de uno de los grupos de técnicas diagnósticas más numerosos pero también es el menos regulado. De forma general, se pueden diferenciar en cuatro tipos:

- Técnicas de detección de ADN. Tras la extracción de ácidos nucleicos, detectan la presencia de ADN de la región de la cápside o del oncogen E6 del VPH. Pueden ser técnicas denominadas “de consenso” (detectan todos los genotipos pertenecientes a los grupos 1 y 2A) o técnicas de genotipado completo (detectan y genotipan los grupos 1, 2A en su totalidad y el grupo 2B casi al completo). Las técnicas de consenso tienen la ventaja de limitarse a la detección de un grupo reducido de genotipos (VPH-AR), los que tienen mayor impacto en el cribado de CCU. Las técnicas de genotipado completo resultan muy útiles para la realización de estudios epidemiológicos y para estratificar el riesgo al informar del genotipo concreto. También se pueden utilizar en el caso de lesiones clínicas donde no se detecten los genotipos más frecuentes.
- Técnicas de detección de ARN. Tras la extracción de ácidos nucleicos, detectan la presencia de ARNm de los oncogenes E6/E7 del VPH. Pueden ser técnicas “de consenso” o técnicas de genotipado de 5 genotipos pertenecientes al grupo 1 (VPH 16, 18, 31, 33, 45).
- Técnicas de hibridación *in situ*. Su sensibilidad clínica y especificidad son insuficientes por lo que no se abordarán en este procedimiento.
- Técnicas serológicas. Aunque la serología se utiliza en estudios de eficacia vacunal y epidemiológicos, no puede utilizarse para el diagnóstico rutinario debido a su baja sensibilidad y especificidad.

7.1. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Según la tecnología utilizada, se pueden clasificar los principales sistemas comerciales disponibles:

- Sistemas de amplificación de señal:

- Captura de híbridos
- Química Invader
- Sistemas de amplificación de la diana con diferentes sistemas de detección:
 - PCR convencional y genotipado mediante hibridación reversa en tira, en *array* o en *arrays* en microesferas en suspensión (xMAP®)
 - PCR en tiempo real
 - TMA y detección en tiempo real o mediante amplificación de señal (“química Invader”)
 - Tecnología DPO™ y análisis de curvas de *melting* (tecnología TOCE™).
 - PCR y detección mediante MALDI-TOF

7.2. VALIDACIÓN CLÍNICA Y MERCADO FDA PARA SU USO EN CRIBADO

Cualquier nueva tecnología que se vaya a aplicar en el diagnóstico de cáncer en general debe demostrar en ensayos clínicos controlados y aleatorizados que su uso disminuye la incidencia de cáncer invasivo a lo largo del tiempo. La detección de ADN del VPH lo ha demostrado con datos de 8 años de seguimiento de pacientes incluidas en cuatro ensayos europeos. Asimismo, la detección de ARNm del VPH lo ha demostrado recientemente con datos de 3 años de seguimiento en otro ensayo.

Debido a que no es viable realizar ensayos controlados aleatorizados longitudinales con todas las pruebas de detección del VPH que se comercializan, un comité internacional de expertos (Meijer CJ, *et al*) propuso en el año 2009 que cualquier prueba debe ser al menos tan precisa como las técnicas utilizadas en dichos ensayos (*gold standard* o método de referencia: PCR GP5+/GP6+ y captura de híbridos) y muy reproducible para poder utilizarla en el cribado primario de CCU en mujeres de 30 años o más. En concreto son unos criterios de validación basados en la sensibilidad y especificidad clínicas, es decir, sensibilidad y especificidad para la detección de lesiones cervicales. Para que una técnica se pueda validar debe demostrar una sensibilidad y especificidad relativas al *gold standard* de $\geq 0,90$ y $\geq 0,98$, respectivamente. Si la prueba tiene una sensibilidad muy elevada se traducirá en un valor predictivo negativo muy alto de la misma, permitiendo la ampliación de los intervalos de cribado en mujeres con resultado negativo, que son la mayoría de las participantes en un programa de cribado. Como contrapartida, dada la baja prevalencia de lesiones premalignas esperables en un cribado poblacional, mínimos descensos de especificidad en la técnica usada, arrojarían

resultados falsos positivos que tendrían repercusiones importantes en el aumento de seguimientos ginecológicos innecesarios y los costes asociados. Estos estudios de no inferioridad suelen realizarse con la ayuda de laboratorios de referencia donde también se evalúa la reproducibilidad intralaboratorio y la concordancia interlaboratorio.

Por otra parte, el protocolo VALGENT (Validación de Test de Genotipado del VPH) es una red internacional y un foro de validación de ensayos de genotipado del VPH. Lleva a cabo la recolección de 1.300 muestras de citología cervical que proporciona un gran laboratorio europeo con capacidad suficiente en su biobanco. Entre estas muestras, se incluye un número suficiente de citologías con lesiones premalignas y también citologías normales para poder calcular la especificidad y sensibilidad de la prueba de detección del VPH. Los informes generales de las evaluaciones se publican en una lista donde aparece claramente si cumple o no los umbrales para su uso en la práctica clínica. El protocolo VALGENT permitirá a los organizadores de programas de cribado realizar las mejores decisiones respecto a cuál es la prueba más conveniente que se debe utilizar.

Asimismo, para conseguir la aprobación de la FDA, una prueba debe establecer su sensibilidad y especificidad clínica mediante estudios prospectivos llevados a cabo en 3 o más lugares diferentes que son evaluados por varias comisiones en un proceso largo y costoso. También debe probar su reproducibilidad, ausencia de reactividad cruzada, contaminación y arrastre, y que dichas características se mantengan a lo largo del período de almacenamiento máximo considerado por el fabricante.

Ciertas técnicas poseen la aprobación de la FDA para triaje de ASCUS y/o para cribado primario. Ninguna la posee actualmente para control post-tratamiento de cáncer cervical, diagnóstico de cáncer anal, detección en varón o en orofaringe.

7.3. COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DISPONIBLES

En la [tabla 2](#), se reflejan las características de las pruebas de detección del VPH validadas clínicamente para cribado cervical.

Abbott Real Time HR-HPV y BD Onclarity HPV son dos técnicas de amplificación de ADN mediante PCR en tiempo real totalmente automatizadas. En el primer

caso se utiliza el sistema Abbott m2000 que consta de un gran módulo extractor (m2000sp) y un módulo de termociclado en placa (m2000rt). Permite el procesamiento a partir de tubo primario e informa de los genotipos 16, 18 y otros no16/18 de forma diferenciada. Al igual que otros sistemas automatizados para la detección del VPH, están indicados para laboratorios con elevada carga de trabajo y permiten la conexión direccional de datos con los principales programas de laboratorio.

BD Onclarity utiliza un aparato de sobremesa (Viper LT) basado en la tecnología *Strand Displacement Amplification* (SDA) con PCR en tiempo real. Es novedoso en tres aspectos: amplifica la región E6/E7, lo que teóricamente podría evitar falsos negativos debidos a la ruptura de la región L1 durante la integración del genoma. Además informa los genotipos que solicita el usuario para cada muestra evitando información y gastos innecesarios: puede informar individualmente 6 genotipos y también puede dar resultados de 3 combinaciones de otros genotipos. Por último, los reactivos no requieren refrigeración y vienen listos para uso. Está en curso su evaluación por la FDA.

Anyplex II HPV HR (Seegene) se basa en la tecnología de PCR multiplex en tiempo real con tecnología DPO™ y TOCE™, de elevada sensibilidad y especificidad. Permite el genotipado completo de los 14 genotipos incluidos en una misma reacción y su cuantificación relativa. La incorporación del sistema NIMBUS permite su automatización por lo que puede escalarse su grado de automatización, resultando adecuado para laboratorios de baja, mediana o elevada carga de trabajo.

El sistema de genotipado de Xpert HPV (Cepheid) destaca por ser el test de menor dificultad y mayor rapidez (1 hora) de los evaluados. Incluye la extracción de ácidos nucleicos en el mismo cartucho de reacción de PCR. Las muestras se procesan de forma individual y se obtiene el genotipado de VPH16 así como de otros 5 grupos de genotipos de alto riesgo. El riesgo de contaminación es mínimo, haciéndolo adecuado para laboratorios con baja carga de trabajo o para situaciones de consultas específicas en las que sea conveniente dar un resultado rápido desde el laboratorio de Microbiología. Con este sistema se puede utilizar medio líquido o torunda seca.

Otras técnicas novedosas de genotipado validadas clínicamente son la detección mediante MALDI-TOF o mediante hibridación reversa con *arrays* en microesferas en suspensión (Luminex) de productos de PCR.

Tabla 2. Características de las pruebas de detección del VPH (Adaptado de Arbyn M, *et al.*, 2015).

Test VPH-AR	Ácido nucleico diana	Gen diana	Amplifica	Genotipado individual	Control de contaminación	Control interno de celularidad	Aprobación FDA para cribado primario	Automatizado
<i>Gold standard, ensayos validados</i>								
Captura de híbridos	ADN	Genoma completo	Señal	No (13 genotipos total)		No	No	No
PCR-EIA GP5+/6+	ADN	L1	Diana	No		No	No	No
<i>Validados según protocolo de Meijer et al., 2009</i>								
APTIMA HPV	ARN	E6/E7	Diana	No (prototipo identifica 16, 18-45)		No. Control interno para ARN y ADN no infeccioso	No	Si
Abbott RealTime High Risk HPV	ADN	L1	Diana	16,18, otros 12 VPH-AR	si	β-globina	No	Si
BD Onclarity HPV	ADN	E6/E7	Diana	16,18,31,45,51,52; 33-58; 56-59-66; 35-39-68		β-globina	No	Si
Cervista HPV HR [^]	ADN	L1/E6/E7	Señal	14 tipos. Tipado reflex aparte: 16, 18		Histona humana 2	No	Si
Cobas 4800 HPV	ADN	L1	Diana	16,18, otros 12 VPH-AR	si	β-globina	Sí	Si
"In house" qPCR(E6/E7) ^{^^}	ADN	E6/E7	Diana	16,18,31,33,35, 39,45,51,52, 56,58, 59,66,68;		β-globina	No	No
HPV-Risk assay	ADN	E7	Diana	16, 18 y otros 13 VPH-AR (HC2 +66+67)		β-globina	No	
PapilloCheck HPV-screening	ADN	E1	Diana	16,18,31,33,35,39, 45,51,52,53,56,58, 59,66,68*		ADAT1	no	No
Anyplex™ II HPV HR	ADN		Diana	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	si	si	no	no
<i>Validados por metaanálisis de estudios transversales o según protocolo VALGENT</i>								
GP5+/6+-LMNX	ADN	L1	Diana	16,18,31,33,35,39, 45,51,52,56,58,59, 66,68**		Fragmento del cromosoma 14	No	
MALDI-TOF	ADN	L1	Diana	16,18,31,33,35, 39,45,51,52,56, 58,59,66,68		β-globina	No	No
HPV Xpert	ADN	E6/E7	Diana	16,18/45, 31/33/ 35/52/58,51/ 59, 39/56/66/68		si	No	No
<p>*También detecta otros tipos de alto riesgo: 70,73,82 y de bajo riesgo: 6,11,40,42,43,44, pero para la validación se consideraron únicamente los tipos mencionados en la tabla.</p> <p>** También detecta VPH 26, 53, 73, 82.</p> <p>*** Capacidad del sistema automático de Abbott m2000: 188 muestras/8 h</p> <p>[^] En un estudio cumple criterios, pero en otro se observa inferior especificidad</p> <p>^{^^} no validada la reproducibilidad intralaboratorio</p> <p>LMNX: Luminex</p>								

Las técnicas validadas para cribado de cáncer cervical son, en su conjunto, técnicas consenso que detectan los genotipos del grupo 1A. Algunas de ellas, también los genotipos 68 o incluso el 66. Aunque no hay duda de la carcinogenicidad de seis genotipos no incluidos entre los 12 del grupo 1A (VPH 68, 26, 66, 67, 73, 82) y de que con su inclusión en pruebas diagnósticas se podría llegar a abarcar el diagnóstico del 98,7% del cáncer cervical, por su baja prevalencia no se considera necesario incluirlos en las pruebas de cribado de cáncer cervical.

También existen en el mercado otras muchas pruebas de genotipado completo como Linear Array HPV Genotyping Kit (Roche Diagnostics) de uso muy extendido, para la detección de 37 genotipos, muy útiles para estudios de impacto vacunal o para conocer la epidemiología de la infección por VPH.

En general, se puede utilizar cualquier técnica que esté validada para el uso indicado, dependiendo de la cantidad de muestras que se analicen, el entrenamiento del personal y la organización general del laboratorio, pero se recomienda la utilización de técnicas automatizadas, mejor si están aprobadas por la FDA, por las ventajas que suponen en cuanto a la estandarización y el control de calidad que ofrecen. A continuación se describen brevemente estas técnicas (**tabla 3**). Las cuatro están aprobadas por la FDA para el triaje de ASCUS en cribado citológico o para cribado con citología y VPH a la vez, pero sólo una técnica en la actualidad está aprobada por la FDA para el cribado poblacional basado en detección del VPH (Cobas® HPV Test).

7.3.1. Hybrid Capture® 2 High-Risk HPV DNA (Digene).

Es la primera prueba aprobada por la FDA (marzo de 2003) para la detección de los genotipos carcinogénicos del VPH. La captura de híbridos es el método más evaluado en la literatura. Es una técnica de amplificación de la señal que utiliza un cóctel de sondas de alto riesgo, que en la última versión incluye 13 tipos del VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otro para el grupo de bajo riesgo que incluye los genotipos 6, 11, 42, 43 y 44, por lo que detecta cualquiera de estos genotipos en dos únicas reacciones, si bien en el cribado de CCU sólo se deben detectar los VPH-AR. El inconveniente es que no discrimina el genotipo presente. Tiene algunas limitaciones como la reactividad cruzada con algunos genotipos de VPH-BR que ocasiona resultados falsos positivos.

7.3.2. Cervista HPV HR® (Hologic).

En el año 2009, la FDA aprobó las pruebas Cervista® HPV HR y Cervista® HPV16/18 para su uso en el cribado de CCU. Es una técnica de amplificación de señal con tecnología *Invader*. Consta de dos reacciones isotérmicas, la primera se produce en la secuencia del ADN del VPH y la segunda produce una señal fluorescente. Incluye un control interno, el gen de la histona humana 2. El resultado informa de la presencia de alguno de los 14 genotipos VPH-AR pero no los detecta de manera individualizada. Cervista HPV 16/18 identifica los VPH16 y VPH18 individualmente.

7.3.3. Cobas® HPV Test (Roche Diagnostics).

El sistema cobas 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) es un sistema totalmente automatizado compuesto por el cobas X, el termociclador cobas Z y el software necesario para la realización de una PCR a tiempo real con primers de la región L1 del VPH. Se pueden procesar tandas desde 22 hasta 94 muestras y es capaz de realizar 1.344 pruebas en 24 horas. Se utiliza el vial primario, es decir, el mismo que para la prueba de citología líquida (reflex). Los resultados aparecen diferenciados en cuatro canales: VPH16, VPH18, otros VPH-AR no16,18 (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66) y beta-globina, que se utiliza como control interno en cada muestra. Tiene una alta sensibilidad clínica y se ha evaluado por numerosos autores en estudios multicéntricos como el ATHENA con gran concordancia con los resultados obtenidos por otras técnicas de referencia. Es de destacar que en los resultados positivos no se han observado reacciones cruzadas con VPH-BR. La reproducibilidad y el grado de automatización son muy elevados. Por todas estas características es uno de los sistemas más extendidos y preferidos para el cribado primario.

7.3.4. Aptima HPV Assay® (Hologic).

Aptima® es una prueba que identifica la presencia de 14 genotipos VPH-AR mediante el ARN mensajero viral de los oncogenes E6 y E7 en citología en medio líquido. No discrimina entre los genotipos presentes. Consta de tres pasos, captura, amplificación mediante el sistema TMA y detección de los productos amplificados por hibridación. También esta prueba incorpora un control interno en cada paso. Se puede realizar en la plataforma automatizada Panther. En caso de utilizar ThinPrep®, la muestra debe transferirse a unos tubos específicos. No realiza genotipado parcial pero ya existe un prototipo que identifica VPH 16 y VPH 18/45. No posee control de celularidad humana. En los estudios publicados, este método ha demostrado ser tan sen-

Tabla 3. Indicaciones clínicas de las técnicas VPH-AR aprobadas por la *Food and Drug Administration*.

SISTEMAS COMERCIALIZADOS	FDA: indicación aceptada	AUTOMATIZACION Nombre (n°muestras/tiempo)
CAPTURA DE HÍBRIDOS (Qiagen)	- CRIBADO VPH+CITOLOGÍA >30 años - TRIAJE ASC-US	NO
CERVISTA (Hologic)	- CRIBADO VPH+CITOLOGÍA >30 años - TRIAJE ASC-US	MTA (96/8 h) HTA (500/8 h)
COBAS 4800 HPV (Roche Diagnostics)	- CRIBADO VPH ≥25 años - CRIBADO VPH+CITOLOGÍA >30 años - TRIAJE ASC-US ≥21 años - VPH16/18 en ASC-US ≥21 y ≥30 años	COBAS 4800 (282/8 h)
Onclarity™ HPV (BD)	- En curso	Viper™ LT (120/8 h)
APTIMA (Hologic)	- CRIBADO VPH + CITOLOGÍA ≥30 años - TRIAJE ASC-US ≥21 años	Panther (240/8 h) Tigris (550/8 h)

NOTA: En todas las pruebas aprobadas por la FDA se ha utilizado el medio de transporte Thin Prep® PreservCyt

sible como las pruebas que detectan ADN-VPH con una especificidad mayor, es decir con menos falsos positivos lo que resulta muy prometedor. Teóricamente la detección de ARNm debería correlacionarse mejor con la transcripción activa de los oncogenes E6/E7. Los datos del ensayo clínico aleatorizado realizado con este test de detección de ARNm se han analizado a 3 años. Debe esperarse a la demostración del bajo riesgo de >CIN3 tras un resultado negativo de ARNm a lo largo de un período de tiempo mayor para que no quepa ninguna duda de su utilidad en el cribado de cáncer cervical a intervalos de 5 años o más.

Los tres últimos ensayos presentan un alto grado de automatización, pudiendo realizar un gran número de pruebas con una mínima intervención humana.

7.4. CALIDAD

El laboratorio de Microbiología donde se realice la prueba de detección del VPH debe tener unos requerimientos imprescindibles como una infraestructura adecuada, el seguimiento de las directrices de buenas prácticas de laboratorio y de procedimientos considerados estándar. También es recomendable la acreditación del laboratorio para pruebas moleculares clínicas así como la participación en evaluaciones intra e interlaboratorio regulares.

En los laboratorios que procesan un elevado número de pruebas de biología molecular y desde hace años para el diagnóstico de diversos patógenos, estos requerimientos de calidad suelen ser mejores pues se dan unas condiciones adecuadas de manejo e instalaciones para evitar contaminaciones. Asimismo se aplicarán las precauciones generales para el manejo de sustancias infecciosas comunes a todos los laboratorios de Microbiología.

En el aseguramiento de la calidad es destacable la importancia del control de calidad interno, la evaluación externa de calidad y la mejora continua de calidad. La red de laboratorios de VPH de la OMS (WHO HPV LabNet) ha establecido, entre otros, el primer estándar internacional de ADN de VPH16 y VPH18. También lidera periódicamente estudios de evaluación de genotipado donde considera un test adecuado si detecta 50UI de VPH16 y VPH18 así como 500 equivalentes de genoma de los otros 12 tipos incluidos en el panel tanto en coinfección como en mono infección. Para ser adecuado también deberá tener una tasa cero de falsos positivos. Aunque es un control para validación analítica de pruebas de genotipado, no se descarta que en un futuro elaboren un panel para evaluación de pruebas de cribado. Otros controles de calidad externos destacables son UKNEQAS (plan de evaluación nacional de calidad externo del Reino Unido) y QCMD

(control de calidad europeo para diagnóstico molecular).

7.5. RETOS

El primer reto debe ser utilizar solo pruebas validadas clínicamente o con marcado de la FDA para el cribado de CCU. También hay que tener en cuenta las discordancias de especificidad y sensibilidad entre las diferentes pruebas cuando se utilizan en programas de cribado, incluso cuando se comparan pruebas comerciales totalmente automatizadas y con marcado FDA. Se deben utilizar pruebas con alta sensibilidad y especificidad clínica y totalmente evaluadas siendo también aconsejable que estén totalmente automatizadas a un precio razonable.

Otro reto importante es conseguir evidencia científica en poblaciones vacunadas, pues todos los estudios de sensibilidad y especificidad del cribado se han hecho con población no vacunada. El rendimiento de las pruebas diagnósticas podría variar en el cribado de la población vacunada.

Mejorar la especificidad de las pruebas de detección del VPH es uno de los objetivos a cumplir en los próximos años, puesto que debido a la elevada prevalencia de infección por el VPH en menores de 30 años, la detección del VPH no puede utilizarse para cribado de mujeres menores de esta edad.

Por último, sería muy útil desde el punto de vista clínico disponer de criterios de validación para poder predecir el riesgo de recaída de lesiones premalignas en los primeros dos años post-tratamiento. Este riesgo es alto, aproximadamente de un 8% y la sensibilidad de las diferentes pruebas de detección del VPH en la predicción de este fracaso puede variar ampliamente.

8. INDICACIONES CLÍNICAS

La detección del VPH debe realizarse en el contexto adecuado y basado en la evidencia científica. Las principales indicaciones clínicas son:

- Cribado primario de CCU para detectar lesiones premalignas, cáncer cervical y descartar a la población sana mayoritaria.
- Triage: la detección del VPH se ha utilizado en el cribado de CCU tradicional basado en la citología, ante un hallazgo anormal de esta, para separar las pacientes que se deberían derivar a colposcopia

por su riesgo de padecer lesiones mas severas de aquellas otras que pueden esperar un periodo de tiempo, generalmente un año, para entrar en otra nueva ronda de cribado.

- Control post-tratamiento (ablativo o escisional): la detección del VPH predice el fallo del tratamiento más rápidamente que el seguimiento citológico. Pero hay que recordar que se debe esperar a los 4-6 meses (según los bordes de la conización estén afectados o no) puesto que la repercusión clínica de la detección del VPH antes de transcurridos estos primeros 4 meses no se ha establecido. Es muy recomendable que los clínicos indiquen esta situación en la petición para poder valorar adecuadamente los resultados.
- Seguimiento ginecológico: control de mujeres con resultados no coherentes en citología y biopsia/colposcopia a las que no se ha indicado tratamiento.
- CA: al igual que en el CCU, las muestras adecuadas son el cepillado y la biopsia anal en caso de observar lesiones sospechosas de displasia anal en la anoscopia de alta resolución. Desafortunadamente, la mayoría de las técnicas automatizadas no están aún validadas para aplicarse en este tipo de muestras.
- CCO: la detección de la presencia del VPH en las biopsias o muestras quirúrgicas se relaciona con un mejor pronóstico y menor número de recaídas. Por la dificultad del acceso a la faringe y laringe, que precisa sedación del paciente, no se realizan controles pre o post-tratamiento

8.1. CRIBADO DE CÁNCER CERVICAL (CCU)

El objetivo principal del cribado de CCU es descartar la presencia de lesiones premalignas en la población de mujeres sanas, pero además otro segundo objetivo, también muy importante, es detectar a las mujeres con lesiones >CIN2 según la clasificación de Bethesda, para iniciar su tratamiento. La citología, prueba utilizada tradicionalmente en el cribado, ha sido muy eficaz en estos años reduciendo notablemente la incidencia de CCU pero carece de sensibilidad adecuada para detectar algunas lesiones premalignas y sobre todo, el adenocarcinoma de útero cuya incidencia esta aumentando en estos últimos años.

8.2. UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE DETECCIÓN DEL VPH EN EL CRIBADO DE CCU

Debido a las razones indicadas en el apartado anterior y por otras claras ventajas, desde hace varios años,

la citología se ha sustituido o se ha utilizado conjuntamente con la prueba de detección del VPH como prueba inicial. La sensibilidad de esta prueba es mucho mayor que la de la citología y es menos subjetiva puesto que a veces, en el caso de la citología, el resultado está influido por la experiencia del citólogo que la examina. Otra ventaja y quizá sea la principal, es que tiene un valor predictivo negativo muy alto, cercano al 100%. Esto quiere decir que si el resultado de la prueba es negativo, la paciente tiene casi nula probabilidad de desarrollar lesiones premalignas en un periodo mínimo de 5 años. De este modo se limitarían el número de rondas de cribado a 5-7 según la edad de inicio o los protocolos adoptados por los distintos países. La influencia en el coste también es importante según los estudios realizados. Por lo tanto, no hay duda en este momento de que, tal como aconseja la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia en su Documento de Consenso de 2014, la prueba inicial que se debe utilizar para el cribado poblacional de CCU debe ser la prueba de detección del VPH. Lo más remarcable de este Documento de Consenso es que no se debe comenzar el cribado antes de los 25 años, que entre los 25 y 30 años se recomienda la citología como prueba inicial por la elevada prevalencia de infección por el VPH en esta edad, y que a partir de los 30 años, como se ha comentado previamente, la prueba de detección del VPH es la opción preferente porque es la que aporta mayores beneficios.

Por otra parte, también hay que considerar que el punto débil de esta prueba es su especificidad, ligeramente inferior a la de la citología. Como consecuencia, en el caso de obtener un resultado positivo en la prueba inicial de detección del VPH, se necesita una segunda prueba, llamada de triaje, con el objetivo de estratificar a las mujeres según el riesgo de sufrir lesiones premalignas en los próximos años. El objetivo de esta prueba de triaje es ahorrar colposcopias innecesarias a aquellas mujeres con citología negativa y test de VPH positivo, ya que está comprobado que tienen un riesgo mínimo de padecer CCU en los próximos años. La prueba de triaje que se aconseja en la Guía de la Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología es la citología y es la que se ha estado utilizando en Holanda y en todos los países con más experiencia y mayor efectividad en los cribados de CCU. Sin embargo, recientemente se han publicado varios estudios evaluando otras opciones con muy buenos resultados como el genotipado parcial (detección separada de los genotipos 16 y 18) o la tinción dual, si bien esta última necesita aun más estudios que avalen los buenos resultados obtenidos en los preliminares.

8.3. ALGORITMO DE CRIBADO BASADO EN EL GENOTIPADO PARCIAL DEL VPH

La elección del genotipado parcial del VPH como prueba de triaje a partir de un resultado positivo en la prueba de detección del VPH, es una consecuencia de la importancia que tiene la persistencia de los genotipos VPH16 y VPH18 en el desarrollo de las lesiones premalignas. Uno de los primeros estudios fue el de Khan MJ, *et al* (2005) en el que se comprobó que la incidencia acumulada de lesiones >CIN3 a los 12 años de seguimiento era del 20% cuando se detecta el VPH16, del 15% cuando está presente el VPH18 y únicamente del 2% si el resultado es positivo para otros genotipos VPH-AR no16,18. Un segundo estudio muy reciente con similares conclusiones es el ATHENA cuyo objetivo principal fue la aprobación del sistema cobas 4800 por la FDA para su uso en el cribado poblacional de CCU. En este estudio realizado en Estados Unidos se incluyeron 42.209 mujeres sanas y en sus conclusiones claramente se confirma la importancia de detectar en los cepillados cervicales la presencia de los genotipos 16 y 18 y distinguirlos de otros VPH-AR no16,18. Los resultados más concluyentes fueron que las mujeres con citología negativa pero con un resultado positivo para VPH16 o 18 tienen un riesgo absoluto estimado en los próximos 3 años de presentar lesiones premalignas >CIN3 del 9,8% y en cambio, si los genotipos presentes son VPH-AR no16,18 el riesgo estimado disminuye al 2,4% (tabla 4).

Teniendo en cuenta la evidencia científica comentada anteriormente sobre la importancia de conocer si los VPH16 y VPH18 están presentes en el cuello del útero, recientemente un panel de expertos ha llegado a un acuerdo de algoritmo de cribado de CCU basado en la prueba del VPH con genotipado parcial como prueba inicial. Las mujeres con resultado positivo para los genotipos más oncogénicos, VPH16 o VPH18, se estudiarán directamente con colposcopia y en cambio, si están infectadas por otros VPH-AR, la citología se utilizará como test de triaje para el seguimiento a los 12 meses o monitorización con colposcopia (figura 4).

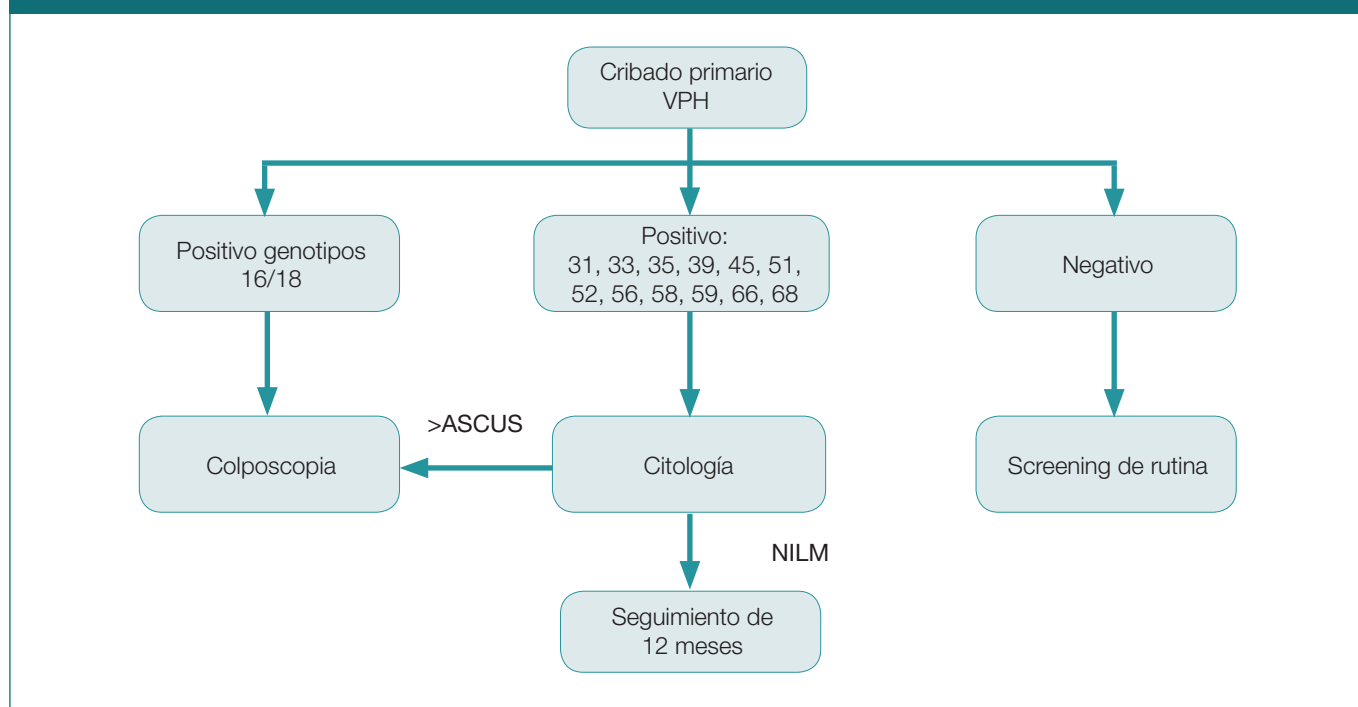
Este algoritmo parece cumplir con los requisitos de ser aceptable, efectivo, eficiente y basado en la evidencia científica actual, tal como las autoridades sanitarias proponen que debe ser un cribado de CCU.

Ahora bien, cualquiera que sea la estrategia de cribado elegida, hay que recordar que el 50% de las mujeres que padecen CCU no han participado nunca en un cribado y el 10% lo han realizado en un periodo

Tabla 4. Riesgo absoluto de lesiones >CIN3 en 3 años de seguimiento en mujeres con citología normal según resultado de prueba de detección de VPH-AR según estudio ATHENA. (Modificado de Wright TC, et al. 2012).

PRUEBA VPH-AR	RIESGO >CIN3 (%)
POSITIVO	4,1
POSITIVO VPH16 y/o VPH18	9,8
POSITIVO VPH16	11,7
POSITIVO VPH18	5,7
POSITIVO VPH-AR no16,18	2,4
NEGATIVO	0,3

Figura 4. Algoritmo de cribado poblacional basado en el genotipado parcial. (Modificado de Huh WK, et al. 2015).



de tiempo superior a 5 años. Por lo tanto, sea con citología, con prueba de detección de VPH-AR, con o sin genotipado parcial, el primer objetivo que hay que conseguir es que el cribado sea poblacional, es decir que se extienda a toda la población diana, mujeres con edades comprendidas entre los 30 y 60 años, que sea de fácil acceso y que tenga una cobertura amplia. La principal función de los microbiólogos como

colectivo debería ser que a nivel de Salud Pública, el plan de cribado sea lo más extenso, sensible y específico posible según la evidencia científica disponible en cada momento pero siempre dentro de un marco de coordinación y coste asumibles. Solamente así habrá alguna esperanza de que esta grave enfermedad totalmente prevenible desaparezca en la mayor parte de los países.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Alemany L, de Sanjosé S, Tous S, Quint W, Vallejos C, Shin HR, et al. Time trends of human papillomavirus types in invasive cervical cancer, from 1940 to 2007. *Int J Cancer*. 2014;135:88-95.
2. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer*. 2015;136:98-107.
3. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5):F88-99.
4. Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, et al. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *J Clin Virol*. 2016; 76(Suppl 1): S14-21.
5. Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21:817-826.
6. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*. 2013; 31(Suppl 7):H1-31.
7. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26(Suppl 10):29-41.
8. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10:321-322.
9. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study 2012; 84:947-956.
10. Cuschieri K, Bhatia R, Cruickshank M, Hillemanns P, Arbyn M. HPV testing in the context of post-treatment follow up (test of cure). *J Clin Virol*. 2016; 76 (Suppl 1):S56-61.
11. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. A. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013; 108:908-913.
12. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11:1048-1056.
13. Documento de Consenso. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Rev Esp Patol* 2014; 47 (Suppl 1):1-43.
14. Durst M, Gissman L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:3812-3815.
15. Erickson B, Alvarez R, Huh W. Human papillomavirus: what every provider should know. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 208:169-175.
16. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, ortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012; 30(Suppl 5):F12-23.
17. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*. 2012; 30 (Suppl 5):F34-54.
18. Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol*. 2015; 235:527-538.
19. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia F, et al. Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: Interim clinical guidance. *Gynecologic Oncology* 2015; 136:178-182.
20. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; 23:1997-2008.
21. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR et al. The elevated 10-year risk of cervical pre-cancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97:1072-1079.
22. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009; 124:516-520.
23. Ponten J, Adami HO, Friberg LG, Gustafsson L, Miller AB, Parkin M et al. VPH and cancer cervical. *Int J Cancer* 1995; 63:317.
24. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014; 383:524-532.
25. Turek LP. The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infections and cervical cancer. *Adv Virus Res* 1994; 44:305-356.
26. Wright Jr TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206:46e1-11.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-VPH-01

Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología básica para la detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH) en muestras relacionadas con procesos en los que el VPH podría estar implicado en el desarrollo de lesiones histológicas de carácter benigno o maligno.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que participen en el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual y en el proceso de cribado primario del cáncer asociado a la infección por el VPH.

2. FUNDAMENTO

La presencia de ciertos tipos del VPH en el aparato genital femenino se asocia a neoplasia intraepitelial cervical, vaginal y vulvar, además de adenocarcinoma de cérvix. En el hombre está relacionado con cáncer de pene y en ambos sexos se asocia a cáncer anal y cáncer orofaríngeo, así como a otras enfermedades entre las que se encuentran el condiloma, la papulosis bowenoide y la papilomatosis laríngea recurrente.

Existen diferentes métodos de detección del VPH, que se diferencian según se basen en el análisis de la presencia del ADN, del ARN que produce el virus o de las diferentes proteínas que se sintetizan a partir del ARN. Para la detección del ADN y el ARN pueden utilizarse métodos sin amplificación (hibridación), o bien métodos con amplificación que aumenten la cantidad del ácido nucleico en el procesamiento previo a la detección. Ambos métodos, con o sin amplificación, se basan en la separación de la doble cadena de ADN mediante el incremento de la temperatura. Tras la separación se multiplica el ADN (mediante la técnica de PCR) o no, y se enfrenta a una secuencia de ADN conocida y complementaria marcada con diferentes procedimientos para su posterior detección. Si se conjuga el ADN problema y el ADN conocido o complementario, este se detecta y se confirma que la muestra es positiva.

Independientemente de la prueba utilizada para la detección del VPH, es importante destacar la necesidad de automatizar las pruebas, ya que de esta manera se disminuye o elimina el procesamiento manual, lo que permite una mayor estandarización, al tiempo que reduce sustancialmente los posibles errores del laboratorio.

La selección de un determinado método debe realizarse en función de los objetivos planteados. Las pruebas de detección del VPH de alto riesgo (VPH-AR) destinadas al cribado deben tener una adecuada sensibilidad clínica, es decir, una elevada capacidad de detectar lesiones de grado CIN2+, así como la mayor especificidad posible, y un valor predictivo negativo cercano al 100%. Las pruebas de detección del VPH-AR utilizadas en la prevención secundaria del cáncer de cuello de útero (CCU) deben siempre tomar como referencia la sensibilidad clínica y estar validadas para dicho propósito.

Las técnicas moleculares actuales con finalidad de cribado permiten la detección específica de algunos tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18 y 45) y una detección inespecífica de otros tipos de alto riesgo, considerando que los protocolos clínicos de seguimiento y monitorización de terapias pueden ser diferentes según el potencial oncogénico del genotipo detectado. Este enfoque es suficiente para un diagnóstico y control de la infección adecuados. Sin embargo queda a criterio del laboratorio realizar técnicas de genotipado específicas de todos o de la mayoría de los genotipos de alto o bajo riesgo, según la finalidad de la determinación, considerando el interés epidemiológico de conocer la distribución de genotipos en la población.

Dado el gran número de pruebas de detección del VPH que existen actualmente en el mercado, es importante establecer los criterios exigibles para aceptar que una determinada prueba es útil en el cribado poblacional:

- Evidencia científica que acredite que la prueba tiene una sensibilidad en la detección de lesiones de grado CIN2+ entre dos rondas de cribado separadas 2-3 años, superior al 90%.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

- Evidencia derivada de ensayos clínicos aleatorizados, u otros estudios publicados en la literatura científica, así como acreditación por parte de agencias como la *Food and Drug Administration* (FDA) o la *European Medicines Agency* (EMA) de la prueba de cribado.
- Elevada especificidad, de manera que se reduzca al máximo la posibilidad de realizar pruebas complementarias innecesarias.
- Facilidad de validar la prueba entre laboratorios, con resultados transferibles.
- Elevada automatización, lo que permite reducir el riesgo de contaminación, así como el tiempo de trabajo manual y, en definitiva, disminuir el volumen de trabajo.
- Posibilitar que la toma de la muestra se realice en un medio universal que permita llevar a cabo otras pruebas complementarias en la misma toma.

A día de hoy, existen alrededor de 140 métodos de detección de VPH en el mundo. Frente a la aparición de nuevas pruebas para la detección del VPH, independientemente de las regulaciones administrativas que sean necesarias para su comercialización, hay que asegurar su validación clínica antes de utilizarlas, tanto en la selección de citologías anormales (células escamosas de significado incierto o ASCUS) como en el cribado primario. Las diversas técnicas presentan distinta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, así como distintos niveles de estandarización. La aplicación de una prueba de cribado del VPH debe validarse para la detección de lesiones de alto grado (lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado o CIN2+) utilizando como método de referencia el diagnóstico histológico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Gimeno C (Coordinadora). Camaró M, Catalá V, Gimeno C, Martínez R, Olmos P. Validación y verificación de los métodos microbiológicos. Procedimientos en Microbiología Clínica 48. SEIMC 2013. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Torné A, Saladrígues MP, Cusidó M, Alameda F, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. Rev Esp Patol. 2014;47:1-43.
5. Manuales de instrucciones de los sistemas diagnósticos.

4. MUESTRAS

Es necesario un método fiable de recogida y manipulación de muestras para proporcionar resultados comparables inter- e intralaboratorio. Esto es especialmente necesario al analizar muestras celulares limitadas a un lugar anatómico. El laboratorio debe elegir uno o más métodos y aplicarlos de forma uniforme, siguiendo las recomendaciones de los documentos de consulta propuestos.

4.1. MUESTRAS DE CÉLULAS EXFOLIADAS DEL CUELLO DEL ÚTERO

El objetivo es obtener una muestra celular del lugar de la infección con el ADN conservado. Las muestras adecuadas se obtienen utilizando los dispositivos de recolección y los métodos habituales de obtención de muestras para citología cervical rutinaria. La zona de transformación del cuello uterino es el sitio del origen de la mayoría de las lesiones neoplásicas del cuello uterino y, es la zona de donde se deben recoger las muestras, del mismo modo que la toma de muestras para citología cervical. Esto requiere de un profesional de la salud capacitado para la realización de un examen pélvico. También se pueden utilizar los métodos de autorecogida, pero se obtiene un mayor componente vaginal.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

Para obtener resultados consistentes y longitudinales en todos los estudios, el método de muestreo debe ser coherente y estar validado para el procedimiento de extracción y detección posterior. Para ello deben seguirse las indicaciones del fabricante en las que se proporcionan ilustraciones para facilitar la comprensión del método de recogida de muestras.

El volumen de los medios de recogida debe mantenerse constante. Los medios de recogida comerciales acuosos tamponados son adecuados y suelen tener un volumen de 1,0 ml. También se puede utilizar solución salina normal (9,0 g de NaCl/l) en alícuotas preparadas con precisión. En los medios de citología líquida se deben seguir las indicaciones del fabricante. Estos medios están diseñados para conservar las células y tienen metanol o etanol, que también preserva el ácido nucleico. Algunos contienen volúmenes mayores de medio (5-20 ml). En cualquiera de los medios la muestra se puede mantener a temperatura ambiente hasta 14 días y es estable a 4°C durante al menos tres meses. Para un almacenamiento más prolongado, es necesario congelar a -20°C. Los medios con metanol y etanol se consideran inflamables y requieren precauciones especiales para su envío al laboratorio.

Si también se requiere la muestra para el diagnóstico citológico, son posibles varias opciones dependiendo del método de toma de muestras y de la preparación de la prueba de Papanicolaou. Si se utilizan los medios acuosos se puede obtener una muestra propia para la prueba de Papanicolaou. Con los medios de citología líquida se puede obtener una alícuota previa a la determinación citológica, con un riesgo escaso de reducir el rendimiento adecuado de la citología. También se pueden hacer alícuotas previamente para la citología, si bien hay cierto riesgo, aunque muy bajo, de contaminación de la muestra. Las muestras se deben manejar con un nivel de bioseguridad 2.

4.2. OTRAS MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DEL VPH

Se pueden obtener otras muestras celulares y de tejidos de las zonas anatómicas con sospecha de infección por el VPH. El laboratorio debe verificar la idoneidad de cada método de recogida de la muestra.

Las biopsias cervicales tomadas de las lesiones cervicales también se pueden utilizar para la detección de ADN del VPH. Estas tomas requieren la coordinación necesaria para asegurar que no se interfiere con el diagnóstico histológico óptimo. La biopsia obtenida para la prueba de detección del VPH se debe congelar rápidamente en un baño de isopentano o sumergirla en solución salina normal y congelarla tan pronto como sea posible. Se puede utilizar el material residual de bloques de parafina fijados con formol para realizar las pruebas de detección del VPH; esto no interfiere con el manejo clínico y permite la confirmación histológica de la muestra que se está analizando.

Para evitar la contaminación entre bloques, cada muestra se debe cortar en el microtomo con una cuchilla desechable e incluir una sección de control negativo a partir de un bloque de parafina vacío. Sin embargo, hay que señalar que el efecto que produce la formalina limita el tamaño de los fragmentos de ADN que se pueden extraer. El procesamiento de "rutina" para histopatología es bastante variable, y estos cambios pueden afectar a la calidad y cantidad del ADN. El fijador de Bouin impide la posterior detección del ADN.

En entornos sanitarios que lo aconsejan se ha demostrado la validez de las muestras tomadas por la propia paciente mediante la inserción de un hisopo en la vagina. Estas muestras se deben manejar de forma similar a la de cualquier otra muestra clínica, y en ellas pueden estar más representados genotipos de bajo riesgo y otros que se encuentran en la vagina con mayor frecuencia.

Las muestras para la detección del VPH se pueden obtener de órganos genitales externos, perineo, ano y mucosa orofaríngea. En superficies queratinizadas se realiza una abrasión suave frotando con un hisopo humedecido para aumentar el rendimiento celular. La muestra del ano requiere insertar un hisopo o un cepillo suave en el margen anal. Los medios de recogida y manipulación de la muestra son similares a los utilizados para las muestras cervicales.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

La orina también se puede utilizar para la detección del VPH. Para la recogida en mujeres no se deben emplear las recomendaciones rutinarias de la recogida de muestras para urocultivo, ya que de este modo se reduce la carga de células vaginales. La orina es menos sensible para la detección de ADN del VPH en comparación con las muestras cervicales pero tiene la ventaja de ser una muestra no invasiva y la exquisita sensibilidad de los métodos moleculares minimizan esta limitación.

En cualquier caso, es obligado realizar controles adecuados para comprobar la presencia de inhibidores de la PCR, así como la carga celular.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Para la realización de las diferentes técnicas se utilizarán los reactivos, controles y calibradores propios de cada determinación. Los reactivos se deben conservar siguiendo estrictamente las indicaciones de los fabricantes. No se utilizarán materiales de dudosa procedencia o conservación ni aquellos que hayan superado su fecha de caducidad.

6. APARATOS Y MATERIAL

Deberán utilizarse las plataformas adecuadas para cada técnica siguiendo las indicaciones de cada fabricante. Se utilizará también material general de laboratorio tanto inventariable como fungible, tal como se indica a continuación:

- Micropipetas (diferentes para cada área de trabajo, áreas 1, 2 y 3).
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo sarstedt).
- Rejillas, bases, tubos y tapas de PCR adaptados al termociclador.
- Bandeja con hielo.
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.
- Hojas de bisturí estériles.
- Placas de Petri estériles.
- Termobloques.
- Microcentrífugas.
- Termocicladores.
- Balanza.
- Matraces y probetas para preparar la suspensión de agarosa.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno microondas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

Los protocolos de mantenimiento de los termocicladores deben estar detallados en la hoja de mantenimiento de equipos y en el plan de control y calibración de equipos del área y deben cumplirse rigurosamente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Existe una amplia variedad de reactivos de extracción de ADN comerciales. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN de tejidos y líquidos biológicos (ver los manuales de los kits de extrac-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de ácidos nucleicos del virus del papiloma humano (VPH)	PNT-VPH-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

ción). Es conveniente prolongar la incubación con proteinasa K, hasta la lisis completa de la muestra (alrededor de 2,5 h). El ajuste de los pasos de lisis y digestión se debe evaluar para aumentar los rendimientos en cada laboratorio, pero una vez que se seleccionan las condiciones óptimas, éstas deben mantenerse constantes. Los extractos de ADN son estables durante períodos cortos de tiempo a 4°C, y por ello se deben almacenar a -20°C para largos períodos de tiempo.

Hay que evitar los ciclos de congelación-descongelación múltiples y se debe tener cuidado para evitar la contaminación durante la extracción y el procesamiento de las muestras. Se debe extraer al menos un blanco de agua con cada lote de muestras. El ADN se debe almacenar preferiblemente en tubos sarstedt con tapón de rosca, cambiando los tapones para evitar problemas de contaminación cruzada. No se deben utilizar tubos de tapón a presión, ya que pueden conducir a la contaminación en la apertura.

7.2. DETECCIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO DEL VPH

Existen diversos métodos comerciales para la determinación del ácido nucleico del VPH que han sido aprobados por la EMA y por la FDA. Recomendamos por tanto seguir el protocolo y las recomendaciones que proporcionan los fabricantes. Para la extracción del ácido nucleico vírico también se propone emplear alguno de los métodos que los fabricantes recomiendan, ya que son los que han sido validados para el uso con dichos protocolos.

Muchas de estas técnicas requieren un gran volumen de muestra de partida por lo que en el caso de tener que realizar diluciones por disponer de muestra insuficiente, se recomienda utilizar para ello suero fisiológico estéril o agua con grado de calidad de biología molecular.

Se recomienda la suscripción a algún programa de control de calidad externo que permita garantizar la correcta realización de la técnica. La OMS tiene un programa de control de calidad de periodicidad anual (HPV LabNet) que permite comprobar la precisión de la técnica utilizada en el laboratorio con estándares de diferentes genotipos de forma aislada y combinada. El control proporcionado por HPV LabNet considera competente a un laboratorio para realizar la detección del ADN del VPH cuando es capaz de detectar 50 UI/5µl de ADN del VPH16 y del VPH18, y 500 equivalentes genómicos (GE)/5µl de otros tipos de VPH; y también si no se obtiene más de un resultado falso positivo en el panel. Se recomienda que los análisis de genotipado deben detectar, como mínimo, los catorce genotipos de más alto riesgo del VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y los dos tipos de bajo riesgo del VPH incluidos en la vacuna actual (6 y 11).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se expresan de forma cualitativa aunque puede existir un valor cuantitativo que se relaciona con la carga vírica detectada, expresado pg/ml (equivalente a 100.000 copias/ml), equivalentes a genoma/µl y UI/µl, dependiendo de la técnica utilizada. En cualquier caso, la interpretación y expresión de resultados debe ser estrictamente las indicaciones del fabricante.

En cada tanda de reacción se deben emplear controles positivos y negativos que aseguren el correcto funcionamiento de la técnica y la ausencia de contaminaciones, respectivamente. Se recomienda no tener una demora en la emisión de resultados superior a 7 días. En caso de emplear una muestra diluida se debe ajustar la cuantificación real y el límite de sensibilidad de la técnica.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos se deberán realizar por el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología Molecular que los emite. Los procedimien-

tos de toma de muestra, su transporte y conservación, deben estar asesorados y controlados por los facultativos responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Biología Molecular. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. Como recomendación general, deberán evitarse, en lo posible las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones en el manejo de las muestras. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR, se debe distribuir el trabajo en 3 áreas perfectamente diferenciadas:

- **Área 1** o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos. En este área no se introducirán muestras ni reactivos que contengan ADN, tanto amplificado como no amplificado. En este área se preparan las mezclas reacción (*master mix*) de la PCR y se distribuyen en alícuotas los reactivos de extracción del ADN de las muestras clínicas.
- **Área 2** o de manipulación de muestras y extracción del ADN. En esta área se procesan las muestras, se realiza la extracción y purificación del ADN y se añade el ADN a la *master mix*. En esta zona no se debe introducir ADN amplificado.
- **Área 3** o de amplificación. En esta área se detectan y procesan los productos de PCR (carga de geles, purificación, etc.).

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa. Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con agentes intercalantes, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que son reactivos tóxicos. La visualización de geles con transiluminador UV debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado de visualización de geles.

Sin embargo, según la técnica realizada, la exigencia tradicional de división de áreas para las técnicas de amplificación es mucho menos crítica para algunas de las técnicas actuales, fundamentalmente las basadas en PCR en tiempo real, ya que no es necesario manipular el producto amplificado al realizarse todo el proceso de amplificación y detección en tubo cerrado.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La prevalencia de infección por el VPH en una población puede afectar a la eficacia en la detección. El valor predictivo positivo disminuye cuando se estudian poblaciones con baja prevalencia o bajo riesgo de infección. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección o niveles muy bajos de infección. También pueden dar lugar a falsos negativos los errores en la toma de la muestra, ya que el resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida. Ocasionalmente, se pueden producir inhibiciones de la PCR que no permitirán obtener un resultado y que se detectarán por la ausencia de amplificación del gen de la β -globina humana. En estos casos se repetirá de nuevo el procedimiento desde el principio, volviendo a extraer el ADN de la muestra si es posible o en su caso analizando el mismo ADN y además una dilución 1/10 del mismo. Si aún así no se consigue obtener amplificación, el resultado deberá informarse como: "muestra inhibida". Las altas concentraciones de crema antimicótica, gel anticonceptivo u otros productos de higiene vaginal en el momento de recoger la muestra, pueden dar lugar también a falsos negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Which high-risk HPV assays fulfill criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:817-826.
2. Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, et al. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virol.* 2009;46 (Suppl 3):S1-S4.
3. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009;124:516-520.
4. Torné A, Saladrígues MP, Cusidó M, Alameda F, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Rev Esp Patol.* 2014;47:1-43.
5. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual. Unger ER, Dillner J (eds.). First edition, 2009; Geneva (Suiza) 2010.