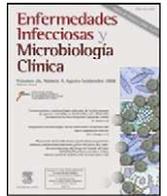


Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Evaluación de un sistema de PCR a tiempo real (cobas 4800) para la detección separada de los genotipos 16 y 18 y otros genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano en la prevención del cáncer cervical

María Luisa Mateos^{a,*}, Jesús Chacón de Antonio^a, Mario Rodríguez-Domínguez^a, Itziar Sanz^b y María Dolores Rubio^c

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

^c Servicio de Ginecología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de noviembre de 2010

Aceptado el 4 de enero de 2011

On-line el 23 de marzo de 2011

Palabras clave:

Virus del papiloma humano

Cáncer cervical

Genotipos de VPH

Cribado de cáncer cervical

R E S U M E N

Introducción: Se ha demostrado que la detección del ADN del virus del papiloma humano (VPH) es más útil que la citología en la prevención del cáncer cervical especialmente si se identifican los genotipos 16 y 18. Cobas 4800 es un sistema automatizado de PCR a tiempo real que detecta separadamente los genotipos 16 y 18, además de otros 12 genotipos de alto riesgo (AR-VPH)

Objetivos: Evaluar la detección de AR-VPH con cobas 4800, especialmente los genotipos 16 y 18 y comparar estos resultados con los obtenidos mediante captura de híbridos (HC2). También se evalúa la sensibilidad clínica del cobas 4800 para detectar lesiones >CIN2.

Materiales y métodos: Se han estudiado 412 muestras cervicales con cobas 4800 y HC2 utilizándose como técnica de referencia una PCR convencional (LA). También se han recogido los resultados citológicos e histológicos de las pacientes

Resultados: En 376/412 muestras los resultados fueron concordantes ($kappa$ 0,85). En la mayoría de las muestras con resultado positivo por HC2 y negativo por cobas 4800 se detectaron genotipos de bajo riesgo con LA. La sensibilidad y especificidad para la detección de lesiones >CIN2 fueron 92,5 y 44% con cobas 4800 y 88 y 51% con HC2.

Conclusión: Hay una gran concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas. Sin embargo, la CH2 es más inespecífica por tener reactividad cruzada con genotipos de bajo riesgo oncogénico, especialmente el 53. Cobas 4800 presenta la ventaja de identificar los genotipos 16 y 18, además de ser totalmente automatizada y no tener reactividad cruzada con otros genotipos

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Evaluation of a prototype real-time PCR assay for the separate detection of human papilloma virus genotypes 16 and 18 and other high risk human papillomavirus in cervical cancer screening

A B S T R A C T

Keywords:

Human papilloma virus

Cervical cancer

HPV genotypes

Cervical cancer screening

Background: It has recently been confirmed that detection of DNA of human papilloma virus (HPV) is more useful than cytology in the screening for cervical cancer, especially if genotypes 16 and 18 are identified. Cobas 4800 is an automated system that detects 14 high risk HPV genotypes: genotypes 16 and 18 separately and 12 other high-risk genotypes pooled.

Objectives: The aim of this study is to compare the performance of the cobas 4800 HPV test against the hybrid capture 2 (HC2) and particularly in women in whom >CIN2 lesions are detected.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mmateos.hrc@salud.madrid.org (M.L. Mateos).

Patients and methods: Aliquots from 412 cervical specimens have been studied with three different assays, real time PCR (cobas 4800), Linear Array HPV test, and HC2. Cytological and histological results were also available.

Results: There was good agreement between the cobas 4800 and HC2 results in 376 of the 412 women (κ 0.85). Where there was not good agreement, low-risk HPV genotypes were detected by linear array in the majority of samples positive by HC2 and negative by the cobas 4800. Sensitivity and specificity for detecting >CIN2 lesions were 92.5 and 44%, respectively, by cobas 4800, and 88 and 51% by hybrid capture.

Conclusions: In this evaluation the cobas 4800 HPV test was shown to have a similar performance to the HC2 test. However HC2 was less specific due to cross reactivity with low risk genotypes, mainly genotype 53. Cobas 4800 is very reliable in the detection of high-risk genotypes, with the advantage of simultaneously providing information regarding genotype 16 and 18 infections.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papovaviridae*. Incluye más de 100 genotipos de los que aproximadamente 40 infectan el área genital masculina y femenina. Por su capacidad oncogénica han sido clasificados como de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (AR-HPV), de probable alto riesgo (pAR-HPV) (26, 53, 66, 68, 73, 82) y el resto de genotipos, como de bajo riesgo de producir cáncer cervical (BR-HPV)¹. Está comprobado que la infección persistente por este virus es la causa del cáncer cervical en mujeres² y del carcinoma escamoso anal en hombres³ además de producir otras lesiones benignas como las verrugas genitales. La infección por el VPH es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en todo el mundo. Sin embargo, a pesar de que muchas mujeres en edad sexualmente activa se infectan por este virus, solo un 10-12% de ellas desarrollarán una infección persistente con un riesgo elevado de progresión a neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 (CIN3) o cáncer⁴. Para el cribado de cáncer cervical, se ha utilizado tradicionalmente la citología o prueba de Papanicolaou. Aunque la citología cervical ha contribuido enormemente a la reducción de la morbimortalidad del cáncer cervical, su sensibilidad para detectar lesiones precursoras de cáncer es muy baja, aproximadamente del 55,4%. En comparación, la prueba de detección del ADN de los genotipos AR-VPH en muestras cervicales tiene una sensibilidad de hasta el 96,6% para detectar lesiones precancerosas aunque es menos específica que la citología⁵. La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia propone esta prueba para el cribado en mujeres mayores de 30 años y en cohortes vacunadas⁶. Sin embargo, el verdadero valor de la prueba de detección del ADN de los AR-VPH es su altísimo valor predictivo negativo cercano al 100% que permite espaciar los cribados con la seguridad de no desarrollar CIN3 en, por lo menos, 3 años y algunos autores aseguran que hasta 5 años^{7,8}. También hay que considerar que no todos los tipos de VPH son igual de oncogénicos. Los genotipos 16 y 18 se encuentran en el 70% de lesiones CIN3⁹ y en el 75% de los casos de cáncer cervical¹⁰. Está comprobado que el riesgo de desarrollar CIN3 en las mujeres infectadas por estos genotipos es bastante mayor que en las infectadas por otros genotipos distintos. Recientemente se ha propuesto un seguimiento distinto de las pacientes mayores de 30 años infectadas con estos genotipos aunque la citología sea normal o células atípicas de significado incierto (ASCUS)^{6,11}. Por lo tanto, es muy importante que las pruebas de detección del ADN de AR-VPH detecten separadamente los genotipos 16 y 18 para hacer un seguimiento exhaustivo a estas pacientes.

El sistema cobas 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) está compuesto por el automático 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. Los resultados aparecen en pantalla diferenciados en cuatro canales: genotipo 16, genotipo 18, otros AR-VPH (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66) y beta-globina que se usa como control interno en cada muestra.

Objetivos

Evaluar la detección de AR-VPH en muestras cervicales con el sistema totalmente automatizado cobas 4800, especialmente los genotipos 16 y 18 y comparar estos resultados con los obtenidos mediante captura de híbridos (HC2). El segundo objetivo es valorar la sensibilidad clínica del cobas 4800 para detectar lesiones >CIN2 puesto que estas pacientes constituyen el objetivo de las campañas de prevención.

Pacientes y métodos

Se han estudiado 430 muestras cervicales pertenecientes a 430 pacientes inmunocompetentes atendidas en la consulta de Ginecología del Hospital Ramón y Cajal para un cribado oportunista de cáncer cervical. La edad media de las pacientes fue de 45 años (rango 16-78 años). Ninguna de ellas había sido vacunada para prevenir la infección por el VPH. Las muestras se recogieron en viales de citología líquida (Preservcyt, Cytyc Corporation, Boxborough, MA) y se almacenaron dos meses a 4 °C hasta su estudio con las dos técnicas, cobas 4800 y HC2 (HPV Hybrid Capture Test, Digene, Gaithersburg, USA). El cobas 4800 es un sistema totalmente automatizado de PCR a tiempo real que detecta por separado los genotipos de AR-VPH 16 y 18 además de otros 10 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) y dos de «probable alto riesgo» (66 y 68).

En las muestras con resultados discordantes, se ha utilizado como técnica de referencia una PCR convencional semiautomatizada con extracción automatizada¹² (Linear Array, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). También se han estudiado los resultados citológicos e histológicos de las pacientes con tinción de Papanicolaou. Se ha utilizado la misma muestra para citología y para la realización de las tres técnicas mencionadas anteriormente.

Para el estudio estadístico se ha utilizado el paquete informático SPSS 12.0 y para medir la concordancia entre los resultados se ha calculado el índice *kappa*.

Resultados

Dieciocho muestras fueron inválidas mediante el sistema cobas 4800, probablemente debido a escaso volumen, presencia de coágulos o fallo de detección del control interno de beta-globina. Por lo tanto, el estudio se ha realizado con 412 muestras. Los resultados cito/histológicos de las 412 pacientes estudiadas fueron las siguientes: 197 normal, 28 ASCUS, 133 CIN1, 17 CIN2 y 37 CIN3.

En 376/412 (91%) se obtuvieron resultados concordantes mediante las dos técnicas, cobas 4800 y HC2 (tabla 1). El índice *kappa* fue de 0,85. Entre las 36 muestras con discordancia en los resultados (tabla 2), 30 fueron negativas por cobas 4800 y positivas por HC2. Al analizarlas con LA, se detectaron 25 genotipos de BR-VPH, uno de AR-VPH y 4 fueron negativas. En las 6 restantes con resultados HC2 negativos y cobas 4800 positivos, se detectaron genotipos BR-VPH en dos de ellas, genotipos AR-VPH en una y

Tabla 1
Grado de acuerdo entre las técnicas cobas 4800 y HC2*

Cobas 4800	CH2		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	156	30	186
Positivo	6	220	226
Total	162	250	412

* Kappa: 0,85.

Tabla 2
Resultados del *Linear Array* para muestras con resultados discordantes

	Negativo	BR-VPH	AR-VPH	Total
Cobas 4800 negativo, HC2 positivo	4	25; 12 genotipos 53, 4 genotipos 70 y otros 14 genotipos diferentes	1; genotipo 58	30
Cobas 4800 positivo, HC2 negativo	3	2; genotipos 6 y 62	1; genotipo 45	6

3 fueron negativas. Todos los genotipos 16 y 18 presentes en las muestras fueron identificados correctamente por cobas 4800. El genotipo 16 se detectó en 84 muestras, (30 con resultados histológicos >CIN2 y 54 con <CIN2) y el genotipo 18 estaba presente en 6 muestras (una con resultado histológico >CIN2 y 5 con <CIN2).

Para la evaluación clínica se han estudiado 54 pacientes con resultados histológicos >CIN2. Se encontraron resultados concordantes en 52/54 muestras (48/54 resultaron positivas y 4/54 resultaron negativas por las dos técnicas). Los genotipos presentes en las 2 muestras con resultados discordantes fueron el 84 y 58. Los valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN) son 20,0 y 97,5% para la CH2 y 21,3 y 96,2% para el cobas 4800. La sensibilidad fue del 92,5 y del 88% y la especificidad del 44 y 51% respectivamente para la CH2 y cobas 4800 (tabla 3).

Discusión

Castle et al¹³ han encontrado una buena correlación entre el sistema comercializado recientemente, cobas 4800 y LA, técnica de PCR utilizada frecuentemente para la detección de AR-VPH en muestras cervicales. Hasta el momento no hay estudios publicados que comparen la detección de AR-VPH con cobas 4800 y HC2. Los datos de nuestro estudio muestran que hay una gran concordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas (kappa 0,85). Las muestras que presentaban resultados discordantes fueron repetidas con ambas técnicas y los resultados no variaron por lo que se descarta error en la realización de alguno de los pasos críticos de las pruebas utilizadas en el estudio. Algunos de los resultados discordantes se deben a resultados falsos positivos con la CH2 que se ha mostrado más inespecífica por tener reactividad cruzada con algunos genotipos de «bajo riesgo» o de «probable alto riesgo» (tabla 2). Otros autores¹⁴ también han confirmado la baja especificidad

Tabla 3
Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cobas 4800 y CH2

	CH2		Cobas 4800		95% IC
	Nº de muestras	Valor	Nº de muestras	Valor	
VPP	50/250	20%	48/225	21,30%	(-0,06,0,08)
VPN	158/162	97,53%	180/187	96,26%	(-0,05,0,03)
Sensibilidad	50/54	92,59%	48/54	88,88%	(-0,18,0,07)
Especificidad	158/358	44%	183/358	51,12%	(-0,01,0,13)

VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.

de la CH2 porque puede reaccionar con genotipos no incluidos en la prueba e incluso con otros ácidos nucleicos distintos al ADN del VPH. Estos genotipos se encuentran muy frecuentemente en las lesiones histológicas <CIN2 pero están ausentes en las lesiones precursoras de cáncer y no es conveniente detectarlos en el cribado de cáncer cervical. En nuestro estudio, el genotipo 53 fue el más prevalente en las muestras con resultados discordantes (cobas 4800 negativas, CH2 positivas) y se encontró siempre en mujeres con resultados histológicos <CIN2. Por otra parte, debido a que no se realizó comprobación con un gel de agarosa, no se puede descartar que algún resultado discordante (3 muestras, tabla 2) sea un «falso positivo» del cobas 4800.

En cuanto a la evaluación clínica, los VPP, VPN, sensibilidad y especificidad son similares con las dos pruebas utilizadas, cobas 4800 y CH2. Es importante tener en cuenta que la identificación y tratamiento de las pacientes con lesiones cervicales >CIN2 es el objetivo principal de las campañas de cribado para la prevención del cáncer cervical. Numerosos artículos confirman que la detección de los genotipos AR-VPH en muestras cervicales es una prueba más sensible que la citología, aunque menos específica, para la detección de las lesiones precancerosas (>CIN2). Esta prueba se utiliza por ahora como complemento a la citología en el cribado primario en mujeres mayores de 30 años, en mujeres posmenopáusicas con resultados citológicos de CIN1, y como prueba de selección en mujeres con citología de ASCUS^{11,15}. Sin embargo, la Agencia Internacional para Estudio del Cáncer ha propuesto que se utilice la detección de genotipos AR-VPH como prueba inicial en el cribado primario de cáncer cervical¹⁶. Cuando se utilizan ambas pruebas, la citología y la detección de AR-VPH, hay un importante número de mujeres con resultados citológicos negativos y detección de ADN de AR-VPH positivo. Está comprobado desde hace varios años que el grupo de mujeres infectadas con los genotipos 16 y 18 tiene un riesgo muy importante de presentar lesiones >CIN2, 20% y 17% respectivamente frente al 1-2% si están infectadas con otros AR-VPH¹⁷. Recientemente se ha confirmado la sospecha de que los cánceres cervicales invasivos ocasionados por los genotipos 16 y 18 se presentan en mujeres más jóvenes que los producidos por otros genotipos¹⁸. Por esto es imprescindible utilizar una prueba de detección de ADN de AR-VPH que identifique separadamente los genotipos 16 y 18 con el objetivo de hacer un seguimiento colposcópico a las pacientes infectadas por los genotipos 16 y 18 a diferencia de las que presentan infección por otros genotipos AR-VPH, cualesquiera que sean, que según un reciente protocolo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia⁶, deben ser controladas al año. El sistema cobas 4800 presenta principalmente la ventaja de identificar separadamente estos genotipos, además de otras como la facilidad del flujo de trabajo del laboratorio, la total automatización de la prueba, la posibilidad de utilizar viales primarios de citología líquida, inclusión de un número elevado de muestras y la ausencia de reactividad cruzada con genotipos no carcinogénicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Muñoz N, Castellsague X, Berrington de González A, Gissman L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3:S3/1-10. Epub 2006 Jun 23. Review.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000;19:1-5.
- Ryan DP, Compton CC, Mayer RJ. Carcinoma of the anal canal. *N Engl J Med*. 2000;342:792-800.
- Genital HPV Infection. CDC Fact Sheet. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga. Disponible en <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFactHPV.htm/cancer>. Agosto 2007.

5. Maynard MH, Duarte Franco E, Rodríguez I, Stephen DW, Hanley J, Ferenczy A, et al., for the Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1579–88.
6. Cortés J, Martín-Torres F, Ramón y Cajal JM, Gil A, Velasco J, Abizanda M, et al. Prevención primaria y secundaria de los cánceres de cuello de útero y vulva: recomendaciones para la práctica clínica. *Prog Obstet Ginecol.* 2010;53 Suppl 1:1–19.
7. Clavel C, Coucherousset J, Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Nazeyrollas P, et al. Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high grade cervical lesions. *Br J Cancer.* 2004;90:1803–8.
8. Wrigth TC, Schiffman M, Solomon D, Cox T, García F, Goldie S, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2004;103:304–9.
9. Mateos Lindemann ML, Sánchez Calvo JM, Chacón de Antonio, Sanz I, Díaz E, Rubio MD, de la Morena ML. Prevalence and distribution of high-risk genotypes of HPV in women with severe cervical lesions in Madrid, Spain: importance of detecting genotype 16 and other high-risk genotypes. *SAGE-Hindawi Access to Research. Advances in Preventive Medicine.* 2011, 269468: 4. doi:10.4061/2011/269468.
10. Safaeian M. Detection of precancerous cervical lesions is differential by human papilloma type. *Cancer Res.* 2009;69:3262–6.
11. Wright T, Massad S, Dunton C, Spitzer M, Wilkinson E, Solomon D, et al. 2006 Consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:346–55. Review.
12. Chacón de Antonio J, Fernández-Olmos A, Mercadillo M, Mateos Lindemann ML, Baquero Mochales F. Detection of high-risk human papillomavirus by two molecular techniques: Hybrid capture and linear array. *J Virol Meth.* 2008;149:163–6.
13. Castle P, Sadorra M, Lau T, Aldrich C, García F, Kornegay J. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic Human Papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV 18 genotyping. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3344–7.
14. Sargent A, Bailey A, Turner A, Almonte M, Gilham C, Baysson H, et al. Optimal threshold for a positive Hybrid Capture 2 Test for detection of human papillomavirus: data from the ARTISTIC Trial. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 554–8.
15. Meijer CJ, Berko 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;124:516–20.
16. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization. IARC handbooks of cancer prevention: cervix cancer screening vol10. IARC Press: Lyon, France; 2005.
17. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer 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;97:1072–9.
18. De Sanjosé S, Quint W, Geraets D, Klaustermeir JE, Lloveras B, Tous S, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology.* 2010; 101016/S1470-2045(10)70230-8.