

DETECCIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO EN LA PREVENCIÓN DEL
CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

MARÍA ALEJANDRA PICCONI

Servicio Virus Oncogénicos, Laboratorio Nacional y Regional de Referencia de Virus Papiloma Humano para las Américas (OPS/OMS), Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos Malbrán, Buenos Aires

Resumen El cáncer cérvico-uterino (CCU), que está fuertemente asociado a la infección por virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), sigue siendo un problema de salud pública en Latinoamérica. El uso de la citología para la detección de lesiones pre-cancerosas no ha tenido mayor impacto en las tasas de incidencia y mortalidad del CCU, que aún se mantienen altas en la región. La disponibilidad de nuevas técnicas de tamizaje para la detección de lesiones pre-cancerosas y de vacunas altamente eficaces que previenen casi todas las lesiones relacionadas con los VPH-AR de alto potencial oncogénico VPH 16 y 18, en mujeres no expuestas previamente al virus brindan una gran oportunidad para la prevención del CCU. La detección de VPH-AR representa actualmente un valioso componente de las guías clínicas para el tamizaje, manejo y tratamiento del CCU y sus lesiones precursoras. Se han desarrollado estrategias metodológicas que detectan un amplio espectro de tipos de VPH-AR; sin embargo, solo un pequeño subgrupo de ellas ha documentado la validación clínica para cualquiera de las indicaciones habituales de la detección de estos virus. Las pruebas de VPH que no estén validadas y que no hayan demostrado confiabilidad, reproducibilidad y exactitud no deben ser usadas en el manejo clínico. Una vez incorporada una prueba de VPH en el laboratorio, es esencial que el procedimiento completo sea sometido a un continuo y riguroso control de calidad para evitar prácticas subóptimas, potencialmente dañinas. Este artículo discute los recientes progresos y el estado actual de estos métodos.

Palabras clave: cáncer cérvico-uterino, tamizaje cervical, virus papiloma humano (VPH), técnicas de tamizaje, validación clínica

Abstract *Human papillomavirus detection in cervical cancer prevention.* Cervical cancer (CC), which is strongly associated to high-risk human papillomavirus (hr-HPV) infection, continues being a significant health problem in Latin America. The use of conventional cytology to detect precancerous cervical lesions has had no major impact on reducing CC incidence and mortality rates, which are still high in the region. New screening tools to detect precancerous lesions became available, which provide great opportunities for CC prevention, as do highly efficacious HPV vaccines able to prevent nearly all lesions associated with HPV-16 and -18 when applied before viral exposure. Currently, hr-HPV testing represents an invaluable component of clinical guidelines for screening, management and treatment of CC and their precursor lesions. Many testing strategies have been developed that can detect a broad spectrum of hr-HPV types in a single assay; however, only a small subset of them has documented clinical performance for any of the standard HPV testing indications. HPV tests that have not been validated and lack proof of reliability, reproducibility and accuracy should not be used in clinical management. Once incorporated into the lab, it is essential to submit the whole procedure of HPV testing to continuous and rigorous quality assurance to avoid sub-optimal, potentially harmful practices. Recent progress and current status of these methods are discussed in this article.

Key words: cervical cancer, cervical screening, human papillomavirus (HPV), screening techniques, clinical validation

Está demostrado que el cáncer cérvico-uterino (CCU) es una consecuencia poco frecuente de la infección persistente por virus papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico. Esta neoplasia sigue siendo un problema

de salud pública en la Argentina y en toda Latinoamérica. El uso de la citología para la detección de lesiones pre-cancerosas no ha tenido mayor impacto en las tasas de incidencia y mortalidad, que aún se mantienen altas. La disponibilidad de nuevas técnicas de tamizaje empleando estrategias virológicas para la detección de lesiones pre-cancerosas, junto con la administración de vacunas altamente eficaces que previenen casi todas las lesiones relacionadas con VPH 16 y VPH 18 en mujeres no expuestas previamente al virus, representan una gran oportunidad para la prevención del CCU.

Recibido: 11-VI-2013

Aceptado: 23-IX-2013

Dirección postal: Dra. María Alejandra Picconi, Servicio Virus Oncogénicos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas- ANLIS Dr. Carlos Malbrán, Av. Vélez Sarsfield 563, 1282 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4301-7428 e-mail: mapicconi@gmail.com

En esta revisión se resumen las principales técnicas comerciales actualmente disponibles para la detección de VPH con fines clínicos, enfocando su fundamento e indicaciones sobre la base de la evidencia científica. La información ha sido obtenida a través de búsquedas bibliográficas usando *Medline/Pubmed, Web of Science, Scopus, Bing, Google Scholar* and *Google*, que finalizan en diciembre 2012. Dado el explosivo desarrollo de nuevos sistemas, se hizo hincapié en aquellas pruebas de mayor uso a nivel mundial.

Principales aspectos biológicos del VPH

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* e infecta y replica en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas)¹. Posee una estructura relativamente simple: una cápside proteica de simetría icosaédrica y en su interior el material genético bajo la forma de ADN doble cadena circular; carece de envoltura (*virus desnudo*) (Fig. 1A). Los genomas de los distintos VPH evidencian una gran similitud en su organización (Fig. 1B). Poseen nueve marcos de lectura abiertos (en inglés "*open reading frames, ORFs*") diferentes; cada uno de ellos representa un gen viral que codifica una proteína responsable de características biológicas tales como el rango de hospedador, el tropismo tisular y la patogenia de la infección. El genoma puede ser dividido en tres regiones^{2, 3}:

La región larga de control (LCR) o región no codificadora, representa el 15% del genoma viral y contiene el origen de la replicación, algunas secuencias promotoras, estimuladoras y represoras de la expresión de genes y de la replicación del DNA.

La región temprana (E, por *early*) representa alrededor del 45% del genoma viral y contiene al menos 7 genes. Codifica proteínas involucradas en la transcripción viral

(E2), la replicación del DNA viral (E1 y E2), la proliferación celular (E5, E6 y E7) y, posiblemente, algunos pasos tardíos del ciclo viral (E4). Los genes E6 y E7 son considerados *oncogenes virales* por su capacidad transformante. Las proteínas que codifican (oncoproteínas E6 y E7) en los VPH de alto riesgo pueden unirse con las proteínas celulares supresoras tumorales p53 y pRB, respectivamente, alterando la proliferación celular y la apoptosis^{2, 3}.

La región tardía (L, por *late*) comprende alrededor del 40% del genoma viral y contiene dos marcos de lectura abiertos, esenciales para la replicación viral productiva. L1 codifica para la proteína principal de la cápside; es un gen altamente conservado en los virus Papiloma de distintas especies y entre los distintos tipos de VPH, razón por la cual es uno de los blancos preferidos para el diagnóstico molecular; mientras que L2 codifica para la proteína menor de la cápside y muestra marcadas diferencias aun entre los tipos que infectan a una misma especie^{2, 3}.

Carga de enfermedad asociada a la infección genital por VPH

La gran importancia del VPH en el campo sanitario se puso de manifiesto con el conocimiento de su potencial oncogénico y su asociación con tumores humanos, en especial con el CCU, que representa el segundo cáncer más común en mujeres en el mundo. Su incidencia mundial es de 530 000 casos por año, 80% de los cuales corresponden a países en vías de desarrollo, con una mortalidad cercana al 50%⁴.

De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud, en la Argentina se diagnostican cada año aproximadamente 4 000 casos nuevos de CCU y cerca de 2 000 mujeres mueren a causa de la enfermedad. Su tasa de incidencia era, en 2008, de 17.5/100 000 mujeres y la tasa de mortalidad, ajustada por edad, de 7.4 muertes/100 000 mujeres⁵.

Los VPH, etiológicamente están asociados prácticamente al 100% de los casos de CCU. También se vinculan con el desarrollo de neoplasias extracervicales, tales como los cánceres de vulva (> 50%), vagina (≈ 65%), pene (≈ 40%), ano (≈ 95%), cabeza y cuello, en especial los orofaríngeos (cavidad nasal, glándulas salivales, amígdalas, lengua, boca, ≈ 60%)⁶. Sin embargo, la incidencia de todos los cánceres extracervicales asociados al VPH es de solo el 12% del total de los cánceres asociados a este virus, lo cual focaliza al CCU como el principal móvil clínico y económico para la prevención^{7, 8}.

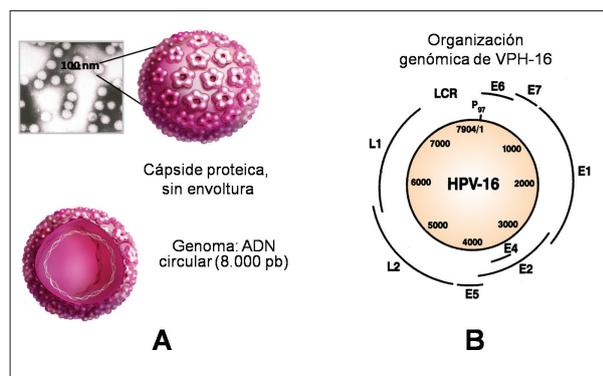


Fig. 1.- **A: Partículas de virus papiloma humano.** La microfotografía muestra los viriones del virus papiloma (coloración negativa, aumento 160 000 x). En los esquemas puede observarse con detalle la morfología esférica de la partícula de VPH con sus capsómeros y el ADN en el interior. **B: Representación esquemática del genoma del HPV 16.** Se indican los genes tempranos (E), tardíos (L) y la región regulatoria (LCR).

Clasificación de los VPH: ¿todos los tipos son igualmente oncogénicos?

Los tipos de VPH que infectan las mucosas son aproximadamente cuarenta. Se subdividen en dos grupos con diferente categoría de riesgo de desarrollo de cáncer⁹⁻¹¹: los VPH de *bajo riesgo* (VPH-BR) entre los que se incluyen

los VPH tipos 6, 11, 42, 43 y 44, comúnmente presentes en las lesiones benignas con mínimo riesgo de progresión maligna, y los VPH *de alto riesgo* (VPH-AR) que abarcan los VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, los cuales, bajo la forma de infección persistente, pueden conducir a la transformación neoplásica. Estos virus son considerados carcinógenos clase I, según lo sugerido por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC 2009)^{10, 11}.

Tipos virales en citología normal y lesiones del cuello uterino de distinto grado

Numerosos estudios han demostrado que el tipo viral más frecuente mundialmente es el VPH 16. Distintos tipos virales pueden ocupar los siguientes lugares en orden de frecuencia según la región geográfica y el diagnóstico citohistológico, entre otros factores.

En mujeres con citología cervical normal, la positividad para VPH oscila entre 10 y 15% a nivel mundial¹². En la Argentina, el estudio poblacional llevado a cabo por la IARC en Concordia (Entre Ríos) mostró una prevalencia de 16.6%, con un pico en menores de 25 años, similar a datos de otros lugares del mundo¹³. Se puede identificar una amplia variedad de tipos virales; en general el VPH 16 ocupa el primer lugar, aunque sin un predominio marcado¹²⁻¹⁴.

En todas las lesiones intraepiteliales del cuello uterino (SIL o CIN) se detecta VPH, ya que es su agente causal; sin embargo, el espectro de los tipos virales varía según la gravedad de la lesión. En las lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL), también llamadas neoplasias intraepiteliales cervicales grado 1 (CIN 1), puede encontrarse gran diversidad de tipos virales. Un metaanálisis mundial observó que el VPH 16 fue el tipo más frecuente (26.3%), seguido de VPH 31 (11.5%), VPH 51 (10.6%) y VPHV 53 (10.2%)¹⁵. En las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL), que comprende las llamadas neoplasia intraepitelial cervical grado 2 (CIN 2) y neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (CIN 3), el espectro de tipos virales es más restringido, con predominio de los VPH-AR, en especial VPH 16 y 18 (50%)^{16, 17}.

En los CCU, los tipos virales que ocupan el primero y segundo lugar son los VPH 16 y 18, respectivamente, alcanzando juntos alrededor del 70% de la etiología de las neoplasias a nivel mundial¹⁶. En América Latina y el Caribe, el mayor metaanálisis realizado que incluyó más de 5500 CCU confirmó este hallazgo, siendo los seis siguientes más comunes los VPH 31, 45, 33, 52, 58 y 35, que sumados a los VPH 16 y 18 son responsables del 86.5% de esta neoplasia en la región¹⁷ (Fig. 2). En este estudio, el subgrupo de 1000 casos de CCU de la Argentina mostró una prevalencia de VPH 16 del 59.5% y de VPH 18 del 17.6% que sumados superan el 77%; estos datos demuestran que las vacunas actualmente

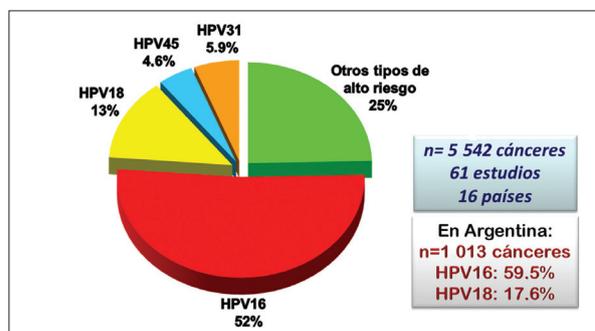


Fig. 2.- Tipos de VPH en cáncer cérvico-uterino en América Latina y el Caribe: una revisión sistemática de estudios epidemiológicos.

(Fuente: Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. PLoS One. 2011;6(10):e25493).

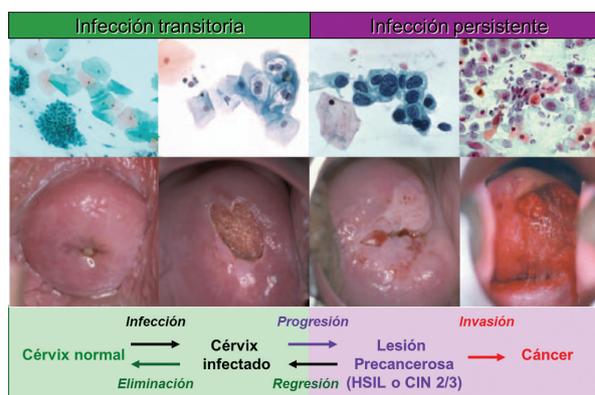


Fig. 3.- Historia natural de la infección por HPV en el cuello uterino. (Adaptado de Schiffman M y col²⁰)

licenciadas, que incluyen a estos tipos virales en su fórmula, son apropiadas para nuestra población¹⁷.

En el caso particular de los adenocarcinomas de cuello de útero, que representan un subgrupo minoritario dentro de los CCU (10-20%), en general más agresivos, la variedad de genotipos virales encontrados es mucho menor; solamente los VPH 16, 18 y 45 son los responsables de más del 90% de estas neoplasias^{16, 18}.

Es frecuente la presencia de más de un tipo viral en muestras anogenitales (20-30%); las implicancias de estas infecciones múltiples en la patogenia del cáncer son aún controvertidas. Trabajos recientes han demostrado que coinfecciones con múltiples tipos virales de alto riesgo se asocian con un riesgo significativamente aumentado de CIN 2 o mayor; sin embargo, el riesgo de enfermedad fue similar a la suma del riesgo estimado en forma individual para cada uno de los tipos virales, con baja evidencia de sinergismo. Aunque con menor frecuencia, en CCU también se han detectado infecciones múltiples, aunque se ha observado que la lesión maligna es inducida solo por uno de los tipos virales presentes¹⁹.

Patogenia de VPH en el tracto genital: infecciones transitorias vs. persistentes

La infección por VPH está ampliamente distribuida en la población general, siendo la infección de transmisión sexual la más frecuente. Se estima que más del 70% de las personas sexualmente activas tendrán contacto con el virus en algún momento de la vida⁸.

La Fig. 3 esquematiza el modelo actual de la historia natural de la infección por VPH y el CCU. La mujer adquiere la infección a través de relaciones sexuales con parejas infectadas, por lo que la frecuencia de esta infección presenta un pico en la edad de inicio de la actividad sexual (15-25 años). Más del 80% de estas infecciones (aun las producidas por los VPH-AR, con o sin anomalías citológicas), son *transitorias*, es decir que son controladas por el sistema inmune y se hacen indetectables en aproximadamente 1-2 años^{9, 20, 21}. Durante la infección productiva, en las células cervicales pueden observarse cambios morfológicos benignos inducidos por el virus, que se asocian con CIN 1 o LSIL.

Por otro lado, existe un grupo minoritario (menos del 20%, aunque numéricamente importante dada la alta circulación viral) de infecciones producidas por tipos de

VPH-AR que persisten; éstas son las infecciones que concentran el foco de la atención, ya que tienen una mayor probabilidad de avanzar a CIN2/3. Se estima que el tiempo necesario para progresar a la malignidad, en caso de permanecer sin tratamiento, es de varios años. El pico de incidencia de las lesiones precancerosas ocurre aproximadamente a los 30-40 años y el del CCU cerca de una década después. Por esta razón, los programas de tamizaje están dirigidos a mujeres a partir de los 25-30 años, con el fin de identificar aquéllas portadoras de lesiones precursoras^{9, 10, 20, 21}.

La Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, Lyon, Francia), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido en 1995 que los VPH-AR son carcinogénicos en humanos²². Esta carcinogénesis está sustentada en evidencias epidemiológicas y experimentales que indican que proteínas de esos virus interfieren en el control de la proliferación celular^{2, 3, 23}. Así se marcó un hito, poniendo fin a la controversia sobre el rol etiológico del virus en el desarrollo del cáncer y señalando a la infección por VPH como condición necesaria para la génesis del tumor. Esto dio lugar a la apertura de un nuevo y amplio campo de trabajo en la inmunoprevención y la aplicación clínica de la detección viral²⁴.

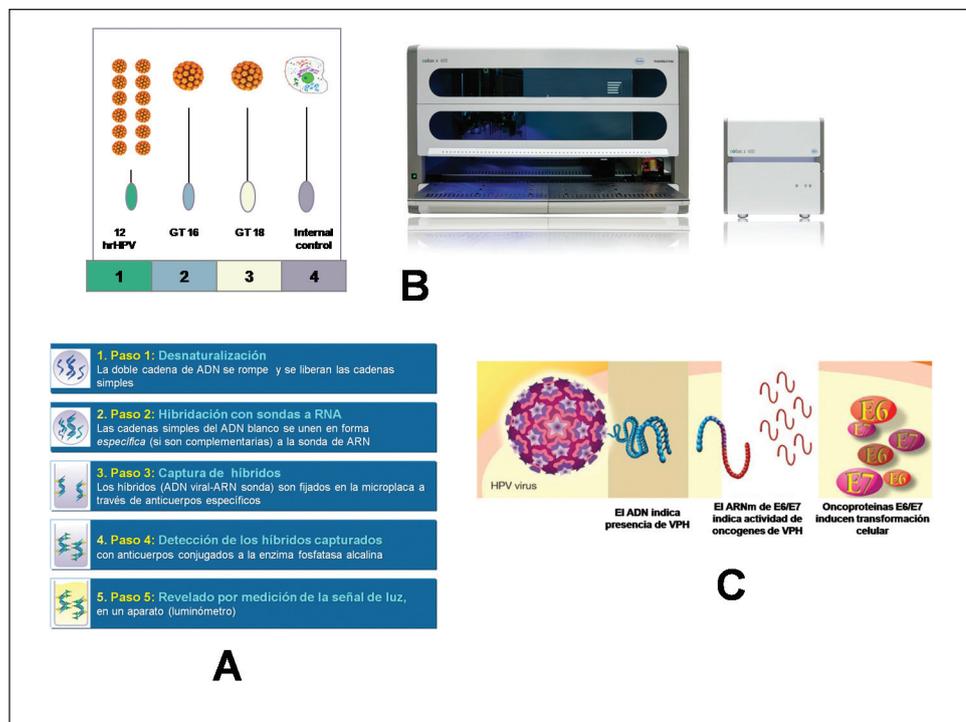


Fig. 4.– Ensayos que detectan los VPH de alto riesgo. **A:** Detección de ADN de VPH por captura de híbridos. Se esquematizan los pasos del ensayo. **B:** Detección de ADN de VPH mediante el sistema Cobas 4800. A la izquierda se muestra un esquema del fundamento y a la derecha una foto del equipamiento. **C:** Detección de ARN mensajeros de los oncogenes E6 y E7 de VPH-AR. Esquema explicativo del ensayo; se representa la corriente en que fluye la información genética: ADN[®]ARN[®]proteínas. La detección de los ARNm de las oncoproteínas E6/E7 es indicativa de la expresión de dichas proteínas virales, las cuales han sido directamente asociadas a la transformación maligna.

Detección de VPH mediante técnicas de biología molecular en la patología cervical

Debido a que el VPH no puede ser propagado en los cultivos celulares convencionales, las pruebas para su estudio se fundamentan en la biología molecular, enfocando la detección de los ácidos nucleicos virales. Existe una amplia variedad de formatos, incluidos aquellos que se basan en la detección de ADN, ARN mensajero (ARNm), los que detectan grupos de VPH-AR y los que identifican tipos virales específicos. La gran mayoría emplea en alguno de sus pasos a la amplificación génica por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto convencional como en tiempo real y/o la hibridación de ácidos nucleicos. Más recientemente se desarrollaron pruebas que detectan la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 de algunos VPH-AR.

Sensibilidad analítica vs. sensibilidad clínica: ¿por qué es importante distinguirlas?

Cuando se evalúa un determinado método para la detección del VPH es crítico considerar la diferencia entre dos conceptos muy importantes: la sensibilidad analítica y la sensibilidad clínica. Cuando se habla de “sensibilidad analítica” se hace referencia a los métodos que son capaces de detectar cualquier infección por VPH, independientemente de la presencia o no de lesiones; en cambio, la “sensibilidad clínica” hace referencia a aquellos métodos que detectan infecciones por VPH asociadas a una enfermedad relevante. En base a estos dos conceptos, la elección de la prueba para detectar el ADN del VPH varía según su aplicación²⁵⁻²⁹.

Los métodos con alta sensibilidad analítica son críticos para la detección precisa del VPH y su genotipificación. Una vez iniciada la vacunación contra VPH, estas técnicas son cruciales para la vigilancia virológica y la identificación del amplio espectro de genotipos de VPH²⁵⁻²⁹. Esto permite evaluar el impacto de la vacunación sobre la prevalencia de los tipos incluidos en la fórmula vacunal, los tipos virales relacionados con la vacuna (protección cruzada), la identificación de nuevos tipos, la discriminación de tipos en las infecciones múltiples y el potencial reemplazo de genotipos. Asimismo, estos métodos son de elección para la investigación epidemiológica de prevalencia de genotipos en distintas poblaciones. Por ello deben emplearse técnicas validadas para estos fines, con certificación internacional establecida por los controles de calidad de la Red Global de Laboratorios de VPH (*WHO HPV Lab-Net*) perteneciente a la OMS³⁰. Estas técnicas se basan en su gran mayoría en ensayos de PCR combinados con hibridación reversa empleando un vasto número de oligosondas tipo-específicas que permite identificar casi la totalidad de los tipos virales que infectan las mucosas

(cerca de 40). Este grupo de métodos no se aplica en la clínica, por lo que su descripción no se desarrollará en este artículo.

Por otro lado, las pruebas de VPH usadas en el control de pacientes requieren de métodos con alta sensibilidad clínica. Estas técnicas serán descritas en detalle a continuación. Tanto los médicos y bioquímicos asistenciales como los profesionales encargados de tomar decisiones en salud pública deberán ser muy cuidadosos cuando seleccionan una técnica a partir de la amplia variedad disponible en el mercado. Para esto, es fundamental contar con información actualizada sobre la validación clínica del método y realizar un análisis costo-beneficio minucioso y responsable teniendo en cuenta el propósito requerido; una opción más segura es optar por los métodos aprobados para el uso clínico por las agencias regulatorias, tanto la nacional (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica; ANMAT) como extranjeras (*Food and Drug Administration*, FDA, EE.UU. y *European Medicines Agency*, EMA, Europa).

Además, debe tenerse en cuenta que, a diferencia de lo que sucede con los sistemas comerciales para la detección de otros agentes microbianos, la gran mayoría de los equipos de VPH que se venden actualmente no incluyen el paso inicial de la extracción del material genético e, incluso, algunos ni siquiera mencionan en sus manuales del fabricante las alternativas metodológicas para realizar dicha etapa; esto debe ser tenido en cuenta, ya que la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra es un paso crítico para el éxito de la determinación viral y debe realizarse en condiciones estandarizadas.

Importancia de la validación clínica

El uso de pruebas de VPH que no han sido clínicamente validadas para el manejo de pacientes representa un serio problema a nivel mundial y se debe en gran parte a la falta de regulación. Los ensayos de detección de VPH para la identificación de mujeres en mayor riesgo de desarrollar CCU difieren de manera significativa de las pruebas moleculares para otros virus de relevancia médica, ya que en los de VPH la sensibilidad analítica no es el principal objetivo, sino que lo que se persigue es la sensibilidad clínica. Lamentablemente, la mayoría de las pruebas de VPH disponibles en la actualidad tienen elevada sensibilidad analítica y, consecuentemente, cuando se los usa para el control de pacientes pueden generar una cantidad de positivos sin significado clínico, originando colposcopias, biopsias y eventualmente tratamientos innecesarios, que en su conjunto pueden dañar física y psico-emocionalmente a las pacientes, invirtiendo el efecto positivo deseado de la acción médica³¹⁻³³. Es extremadamente necesario que los fabricantes pongan esfuerzo en la validación clínica de sus pruebas siguiendo los estándares acordados internacionalmente, usando los

puntos-finales validados clínicamente; asimismo, es de suma importancia que los resultados de estos ensayos clínicos sean publicados en revistas internacionales con revisores que avalen su rigor científico.

Indicaciones para la aplicación de las pruebas de VPH en la práctica clínica

Las principales indicaciones consensuadas internacionalmente para el uso de las pruebas de ADN de VPH en la práctica clínica actual son las que se enumeran a continuación^{29, 34, 35}.

Esclarecimiento de citologías atípicas de significado indeterminado (ASCUS). El término proviene del inglés *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* y significa cambios atípicos en las células escamosas del cuello uterino que no pueden ser específicamente clasificados. La existencia de ASCUS no debe alarmar, pues no significa enfermedad; sin embargo, es necesario su esclarecimiento. Una gran parte de los casos de ASCUS corresponde a alteraciones benignas, pero este grupo de mujeres tiene mayor riesgo de patología significativa comparada con la población general, por lo que requieren seguimiento. Existe evidencia consistente que indica que las pruebas de VPH son más seguras que la repetición de la citología para los casos de mujeres que tuvieron resultado de ASCUS³⁴⁻³⁶.

Seguimiento de mujeres con resultados citológicos anormales que resultaron negativas a la colposcopia/biopsia inicial. Las pruebas de VPH, en especial las que permiten genotipificar VPH 16 y 18 o detectar ARNm pueden ayudar a identificar mujeres en mayor riesgo de desarrollar lesiones graves; sin embargo, las mujeres que resultaran negativas para estos ensayos deben seguir siendo controladas^{34, 35, 37}.

Control post-tratamiento de lesiones CIN2 o más graves (CIN2+). Las mujeres que han sido diagnosticadas con lesiones CIN2 o CIN2+ y sometidas a terapia de ablación o conización deben ser seguidas después del tratamiento. A pesar de que más del 90% de mujeres curan, hay un riesgo de recurrencia de CIN o de desarrollo de cáncer invasor. Los datos actuales indican que las pruebas de VPH son capaces de detectar la enfermedad residual o recurrencia más rápidamente, con mayor sensibilidad y similar especificidad que el seguimiento citológico^{34, 38}.

Tamizaje primario en mujeres a partir de los 30 años para detectar lesiones precursoras de CCU: las pruebas de VPH ofrecen numerosas ventajas cuando se las compara con el tamizaje citológico; entre ellas, son pruebas sensibles, altamente reproducibles, objetivas (con mínima influencia del operador) y con estándares para control de calidad de uso en cada tanda de determinaciones. En particular, el elevado valor predictivo negativo de estas pruebas (cercano al 100%) permite confiar en que un re-

sultado negativo significa con un alto margen de seguridad que la mujer no tiene VPH; esto ha permitido considerar la ampliación del intervalo de tamizaje, espaciando los controles al menos 5 años^{34, 37, 39, 40}.

Sin embargo, aun entre las mujeres mayores de 30 años, la relación entre cáncer cervical e infección transitoria es baja y los ensayos de VPH deben superar el problema intrínseco de un valor predictivo positivo bajo. Esta relativa menor especificidad de las pruebas de VPH hace necesaria una prueba adicional en las mujeres que son positivas para ADN de VPH en el tamizaje primario, que se conoce en inglés como *triage test* o prueba de triaje. Esta prueba permite, por un lado identificar a aquellas mujeres que están en riesgo de ser portadoras de una lesión precursora del cáncer cervical y por otro, tranquilizar a aquellas que solo tienen una infección transitoria o de bajo riesgo^{34, 37, 39, 40}.

Para el triaje pueden emplearse los métodos de inspección visual, la citología y los biomarcadores moleculares. Entre estos últimos, podemos diferenciar aquellos que son indicadores directos de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 (ARNm y oncoproteínas) que serán desarrollados más adelante en el presente artículo. Por otro lado, están los biomarcadores de proliferación celular aumentada e inestabilidad genética, entre los que se encuentran la detección de las proteínas celulares p16^{INK4a}, Ki-67, topoisomerasa IIA (TOP2) y proteínas de mantenimiento de minicromosoma (MCM)^{40, 41}; este último subgrupo no será tratado en esta revisión, ya que abarca técnicas dirigidas a blancos celulares, no virales.

Actualmente, se están desarrollando algoritmos que emplean como tamizaje primario la prueba de VPH, bajo diferentes contextos y adaptándose a las necesidades locales^{39, 40}. En la Argentina, el Programa Nacional de Prevención del Cáncer Cérvico-Uterino (Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación) implementó el tamizaje primario empleando la prueba de VPH, con el triaje por citología en aquellas mujeres que dieron la prueba de VPH positiva, a fin de confirmar la presencia de anomalías citológicas. Esta decisión se basó en las evidencias científicas que han demostrado una mayor sensibilidad de la prueba virológica en la detección de lesiones CIN2/3^{34, 37, 39, 40}. Dado el alto valor predictivo negativo de la prueba, se espaciarían a 3 años los controles en caso de un resultado de VPH negativo. Esta estrategia de tamizaje se inició en 2011 en la provincia de Jujuy, para mujeres entre los 30 y 64 años; en 2013 se extenderá a Catamarca, Misiones y Neuquén, y en forma gradual a todo el país⁴².

Debe tenerse en cuenta que no todos los ensayos están validados para la totalidad de las aplicaciones clínicas descriptas anteriormente. A continuación, se detallarán las pruebas de VPH de mayor uso global, con sus indicaciones clínicas específicas.

Ensayos de detección de VPH más usados con fines clínicos: fundamento y características generales

La variedad de técnicas de uso en la práctica clínica para la detección de VPH se ha ampliado enormemente en la última década. Actualmente, se estima que hay disponibles en el mercado más de cien pruebas comerciales²⁹. Estas pruebas pueden ser divididas en tres grupos según detecten: a) el ADN de los VPH-AR (sin ningún tipo de genotipificación individual), b) ADN de los VPH-AR con la concomitante genotipificación parcial de algunos de los principales tipos de alto riesgo y, c) ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR.

Más recientemente se han desarrollado dos pruebas que detectan la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 en el epitelio cervical, empleando anticuerpos monoclonales. Una de ellas es *AVantage HPV E6 Test*TM (Arbor Vita Corporation, Fremont, EE. UU.) que identifica la proteína E6 de los VPH tipos 16, 18 y 45, en un formato de tira (*strip*)^{40,43}. El otro ensayo fabricado por *OncoHealth*

(San Jose, EE.UU.) presenta un formato de ELISA y puede ser acoplado a la citología líquida⁴⁰. Se trata de pruebas relativamente rápidas y sencillas, de costo reducido y bajo requerimiento de infraestructura. Si bien todavía no hay información publicada sobre su validación clínica, los datos preliminares parecen ser alentadores en relación a su alta especificidad y elevado valor predictivo positivo; esto haría posible identificar mujeres con riesgo aumentado de pre-cáncer o CCU, llevando a cabo una menor cantidad de colposcopias o biopsias, comparado con lo requerido cuando se usan sistemas de detección de ADN de VPH. Sin embargo, la baja sensibilidad que alcanzan estas pruebas plantea un interrogante en relación a cómo implementarlas; ¿solo serían alternativas de triaje o también podrían usarse en el tamizaje primario? En este último caso se necesitaría, además, que las pruebas puedan detectar las oncoproteínas de todos los tipos de VPH-AR.

La Tabla 1 resume los principales sistemas de detección de VPH que se aplican actualmente en la clínica.

TABLA 1.— *Sistemas comerciales para la detección de VPH en la práctica clínica más usados a nivel mundial.*

Ensayos para VPH-AR	Estado actual
- Ensayos para ADN VPH-AR sin genotipificación	
Hybrid Capture [®] 2 (HC2) HPV DNA Test (QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD; USA (antes Digene Corp.))	Aprobado FDA (2003) ^{a, b}
EIA kit HPV GP HR (Diassay, Rijswijk, The Netherlands)	Validado clínicamente ^a
Cervista [®] HPV HR Test (Hologic, Madison, WI)	Aprobado FDA (2009)
CareHPVTM Test (QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD; USA)	Validado clínicamente
- Ensayos para ADN VPH-AR con concurrente genotipificación parcial de los principales VPH-AR	
cobas [®] 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA)	Aprobado FDA (2011) ^{a, b}
RealTime High Risk HPV test (Abbott Molecular, Des Plaines, IL)	Validado clínicamente ^a
Cervista HPV 16/18 Test (Hologic, Madison, WI)	Aprobado FDA (2009)
digene [®] HPV Genotyping PS Test, RUO (Qiagen, Hilden, Germany)	Aprobado FDA (2009)
- Ensayos para ARNm de E6/E7 de VPH-AR	
APTIMA [®] HPV Test (Gen-Probe Inc., San Diego, CA)	Aprobado FDA (2011)
PreTect HPV-Proofer (NorChip, Klokkestua, Norway)	Aprobado FDA (2011)
NucliSENS EasyQ [®] HPV (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France)	Ampliamente usado con fines específicos ^b

^aValidado clínicamente de acuerdo a los requerimientos internacionales para su uso en el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años.

^bDisponible en Argentina.

VPH: virus papiloma humano; VPH-AR: tipos de virus papiloma humano de alto riesgo. FDA: Food and Drug Administration, EE.UU.

Ensayos que detectan los VPH de alto riesgo (VPH-AR)

Las pruebas para ADN de los VPH-AR constituyen un grupo de ensayos cualitativos y semicuantitativos que detectan en conjunto tipos virales considerados oncogénicos, empleando varias tecnologías, no permitiendo la distinción de un tipo o más tipos virales de manera individual. El uso de estas pruebas ha sido aceptado en: 1) Triaje de mujeres con citología ambigua o indeterminada, 2) Seguimiento después del tratamiento de neoplasias intraepiteliales de alto grado (CIN 2+) y 3) tamizaje primario^{34, 39, 44}. En este grupo cabe mencionar los siguientes ensayos:

Captura de Híbridos 2 (HC2): fue desarrollado originalmente por *Digene Corporation* (Gaithersburg, MD, EE.UU.) y actualmente comercializado por *Qiagen* (MD, EE.UU.). Es la prueba más antigua y más frecuentemente usada a nivel mundial y está disponible en la Argentina. Se fundamenta en una hibridación de ácidos nucleicos en fase líquida (Fig. 4A). Las células cérvico-vaginales son tratadas con una solución alcalina desnaturante que expone el material genético. La hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta exigencia con una mezcla de ribosondas (sondas ARN) correspondientes a los 12 tipos de VPH-AR (VPHs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) más el VPH-68. Estas 13 sondas constituyen la denominada mezcla B. La presencia de cualquiera de estos virus en la muestra permite la formación de un híbrido ADN viral (muestra)- ARN sonda que es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico conjugado con fosfatasa alcalina. El revelado de los híbridos se realiza por la acción de un sustrato quimioluminiscente, necesitando un aparato especial (luminómetro) para realizar la medición de la luz emitida. Esta lectura final, además de determinar si la muestra resultó o no positiva, permite una semicuantificación. La prueba no identifica tipos virales individuales; detecta la presencia de uno o más tipos de VPH-AR, sin genotipificar. Fue aprobada por la FDA (EE.UU.) en 2003 para: 1) esclarecimiento de citologías ambiguas con presencia de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), y 2) tamizaje, junto con la citología en mujeres a partir de los 30 años. HC2 ha sido evaluado en numerosos estudios de cohorte, aleatorios y controlados, que incluyeron a cientos de miles de mujeres en todo el mundo, los cuales han demostrado su valor clínico^{26, 28, 34, 36, 37, 39, 45, 46}. Por lo tanto, las nuevas pruebas de VPH no necesitan ser evaluadas en ensayos clínicos específicos, sino que deben mostrar que poseen características clínicas equivalentes (no inferiores) al HC2, antes de ser usadas en tamizaje²⁶. Esta prueba también tiene aplicación en el control post-tratamiento de lesiones CIN2 o más graves⁴⁷.

Los siguientes ensayos comerciales han sido validados clínicamente, pero no están actualmente disponibles en la Argentina:

The Cervista® HPV HR Test (Cervista) (*Hologic*, Madison, WI, EE.UU.): fue la segunda prueba para VPH licenciada en EE.UU. Se basa en lo que se conoce como "química invasora" como método de amplificación de la señal para la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos virales. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas: una que se produce en la secuencia de ADN blanco y la otra que genera la señal fluorescente. Detecta cualquiera de los 12 tipos de VPH-AR más el HPV 68. En 2009, la FDA la aprobó para las siguientes aplicaciones clínicas: 1) triaje de pacientes con citología ASCUS, y 2) tamizaje en mujeres a partir de los 30 años. Los dos ensayos clínicos más importantes que avalan estas aplicaciones son: un estudio prospectivo, multicéntrico que enroló a 1347 mujeres con ASCUS en EE.UU.⁴⁸ y un estudio en base poblacional, transversal, conducido en China sobre 8556 mujeres entre 25 y 59 años⁴⁹. En 2011, la FDA aprobó la versión automatizada (*Cervista HTA system*).

CareHPV™ Test (QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD; EE.UU.): es un ensayo relativamente rápido, sencillo y accesible, basado en una versión simplificada de la tecnología de HC2. Puede ser usado en lugares con muy limitada infraestructura y el paciente puede contar con los resultados durante la misma visita. El principal estudio clínico que avala su aplicación para el tamizaje primario es el realizado en zonas rurales de China⁵⁰.

EIA kit HPV GP HR (Diassay, Rijswijk, Holanda): permite detectar cualquiera de los tipos de VPH-AR. Emplea una PCR usando los cebadores genéricos GP5+/6+ y revelado por lectura de densidad óptica^{29, 45}. Es el segundo método más evaluado en ensayos clínicos, luego de HC2. Su espectro de uso sería: 1) tamizaje primario, 2) control de mujeres con citología de ASCUS; 3) control post-tratamiento en mujeres tratadas por CIN de alto grado.

Ensayos para detectar ADN de VPH-AR con la concomitante genotipificación parcial de los principales tipos de alto riesgo

Estas técnicas constituyen un grupo de ensayos más reciente, en los que la detección de 13 o 14 tipos de VPH-AR está combinada con la concomitante identificación individual de los VPH tipos 16 y 18 u otros tipos relevantes. Su diseño se basó en los resultados de estudios clínicos que demostraron un potencial oncogénico notablemente superior de los tipos de VPH 16 y VPH 18 comparado con otros tipos de VPH-AR; asimismo, se evidenció que las pruebas capaces de distinguir estos dos tipos virales permiten identificar mujeres con riesgo aumentado de desarrollar CIN3, haciendo posible un control mayor e intensivo en relación a las pacientes infectadas con otros tipos de VPH-AR⁵¹. Entre ellos cabe mencionar:

- ***Cobas® 4800 HPV Test (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, EE.UU.)***: actualmente es la única

prueba de este grupo que está licenciada en EE.UU. para uso clínico disponible en la Argentina. Presenta un formato automatizado, compuesto por el equipo cobas X para la preparación de la muestra y el cobas Z (*software* incluido) para la realización de una PCR en tiempo real que amplifica un fragmento de gen viral L1. Esta reacción es una variante mejorada de la PCR convencional que permite un proceso de amplificación génica y detección simultánea del ADN amplificado en "tiempo real"; el monitoreo simultáneo del progreso de la amplificación del ADN blanco se logra mediante una reacción química que usa compuestos fluorescentes que proporcionan una detección específica, empleando instrumentación especialmente diseñada para la lectura (Fig. 4B). Este ensayo está dirigido a la detección de cualquiera de los 12 tipos de VPH-AR (IARC-2009), más los VPH 66 y 68; además permite identificar en forma individual, en la misma tanda a los VPH 16 y 18. Los resultados aparecen en pantalla diferenciados en cuatro canales: genotipo 16, genotipo 18, otros VPH-AR y beta-globina, que se usa como control interno en cada muestra. Fue aprobado por la FDA en 2011 para las siguientes indicaciones: 1) triaje de mujeres a partir de los 21 años con ASCUS para determinar la necesidad de derivación a colposcopia; 2) pacientes a partir de los 21 años con ASCUS para evaluar la presencia o ausencia de los HPV 16 y 18; 3) mujeres a partir de los 30 años para ser usado en forma conjunta con la citología, a fin de evaluar la presencia o ausencia de los tipos de VPH-AR; 4) mujeres a partir de los 30 años para evaluar la presencia o ausencia de los HPV 16 y 18. El principal estudio clínico que apoyó las indicaciones aprobadas se realizó en EE.UU., es prospectivo y multicéntrico (estudio ATHENA), e incluyó 47 208 mujeres de 21 o más años, enroladas para el tamizaje de rutina⁵²⁻⁵⁴. Esta prueba también fue validada clínicamente de acuerdo a los parámetros establecidos por las guías internacionales para su uso en el tamizaje primario para cáncer cervical en mujeres a partir de los 30 años^{26, 44, 45, 50, 54-56}.

- *Cervista HPV 16/18 Test (Hologic, Madison, WI, EE.UU.)*: aprobada por la FDA en 2009, puede aplicarse como complemento de la técnica de *Cervista HPV HR* para mujeres que resultaron positivas. El principal ensayo clínico en el cual se basó la aprobación para su aplicación en el triaje de mujeres con citología de ASCUS fue un estudio multicéntrico prospectivo de 1347 mujeres⁴⁸. Esta metodología no está por el momento disponible en la Argentina.

- *Abbott RealTime High Risk HPV test (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EE.UU.)*: este ensayo se basa en una reacción de PCR en tiempo real que permite: a) la detección conjunta de 14 tipos de VPH-AR (los 12 descritos por la IARC-2009, más los VPH 66 y 68), y b) la genotipificación individual de VPH 16 y 18, de manera simultánea. Entre los principales ensayos clínicos que avalan esta prueba cabe mencionar los desarrollados en

el Reino Unido y Canadá que demostraron su utilidad en el esclarecimiento de ASCUS^{57, 58}. La prueba ha cumplido las normas de validación clínica establecidas por las guías internacionales en cuanto a los requerimientos de los ensayos de ADN de VPH para tamizaje primario de cáncer de cérvix en mujeres a partir de los 30 años, en estudios prospectivos llevados a cabo en Eslovenia y retrospectivos en Italia, en 3129 y 998 mujeres, respectivamente^{59, 60}. Se encuentra en evaluación para su aprobación en la FDA y hasta la fecha no está disponible en la Argentina.

Ensayos que detectan ARNm de las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH-AR

Existen diversas estrategias metodológicas para la detección de los ARNm de los VPH-AR. La mayoría de ellas tiene como blancos a los transcritos correspondientes a las oncoproteínas virales E6 y E7 dada su relevancia patogénica. A diferencia de las pruebas de ADN que solo brindan información acerca de la presencia de la infección y eventualmente del tipo viral, la detección de los ARNm de E6 y E7 permite identificar los genotipos de VPH más frecuentes en el cáncer de cérvix y además es indicativa de la expresión de dichas proteínas virales, las cuales han sido directamente asociadas a la transformación maligna (Fig. 4C). Esto brinda al ensayo un mayor valor predictivo positivo que las pruebas de ADN en cuanto a la actividad carcinogénica viral. Varios estudios recientes han mostrado que estas pruebas pueden ser de utilidad clínica por su mayor especificidad para la detección de enfermedad cervical^{61, 62}. En este grupo cabe mencionar las siguientes técnicas:

- *APTIMA® HPV Assay (Gen-Probe Inc., San Diego, CA, EE.UU.)*: es el único ensayo aprobado por la FDA hasta el presente, aunque aún no está disponible en la Argentina. Permite la detección de ARNm de los 12 tipos de VPH-AR según IARC-2009, más VPH 66 y 68, pero no discrimina ninguno entre ellos. La técnica involucra tres pasos principales que tienen lugar en un único tubo: captura de las secuencias blanco, amplificación génica mediada por transcripción (TMA) y la detección de los productos amplificados a través de una hibridación, cuyos productos son revelados por quimioluminiscencia con emisión de luz. Datos recientes indican que esta prueba no solo detecta ARNm sino también ADN; sin embargo, la sensibilidad para el primero es marcadamente superior^{62, 63}. Fue aprobada por la FDA en 2011 para el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años, en combinación con la citología. Los principales ensayos clínicos en los que se basó esta indicación fueron el estudio CLEAR, el cual involucró a 11 000 mujeres que llevaban a cabo su citología de rutina en EE.UU. y el estudio FASE desarrollado en un grupo de 5000 mujeres francesas^{64, 65}. Un reciente metaanálisis mostró que en el escenario de triaje, la prueba es igual de sensible, pero

más específica que HC2 para la detección de lesiones precancerosas cervicales⁶⁶.

- *PreTect HPV-Proofer (NorChip, Klokkarstua, Noruega)* y *NucliSens EasyQ® HPV V1 test (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Francia)*: son dos variantes comerciales del mismo ensayo basado en la tecnología NASBA, que involucra una reacción de PCR en tiempo real isotérmica. La prueba permite la detección de los transcritos ARNm correspondientes a las oncoproteínas virales E6/E7 de los 5 tipos de VPH-AR más frecuentes en cáncer cervical a nivel mundial: VPH 16, 18, 31, 33 y 45. La versión francesa está disponible en la Argentina. De manera similar a lo informado para APTIMA, se demostró que esta prueba detecta también ADN, aunque en una proporción sustancialmente menor⁶². Varios trabajos han indicado que estos sistemas presentan menor sensibilidad clínica que las pruebas basadas en ADN para la detección de lesiones de grado CIN2 o mayor, pero tienen una especificidad clínica significativamente mayor^{62, 67, 68}. Se ha sugerido que la menor sensibilidad podría deberse, al menos en parte, a que detecta solo 5 tipos de VPH-AR^{29, 67}. Los principales protocolos clínicos que apoyan su aplicación en el triaje de ASCUS son: estudio canadiense (1550 mujeres)⁶⁹, estudio PREDICTORS-1 (953 mujeres del Reino Unido)⁷⁰, estudio en Italia (700 mujeres)⁷¹ y el estudio noruego (358 casos de ASCUS y 522 de LSIL)^{72, 73}. De acuerdo a estos datos, se considera una metodología de utilidad en la evaluación de pacientes con citologías anómalas por su elevada especificidad clínica.

Control de calidad de las pruebas de VPH

Un aspecto de suma importancia es el control de calidad de estas técnicas⁷⁴. El Manual de Laboratorio publicado por la Red Global de Laboratorios de VPH de la OMS (*WHO HPV LabNet*)⁷⁵ provee especificaciones sobre las mejores prácticas y procedimientos de control de calidad para los laboratorios que realizan ensayos de VPH⁷⁴⁻⁷⁷. Para asegurar la calidad de los resultados, estas pruebas deben hacerse solo en laboratorios calificados, que estén acreditados y cumplan con las condiciones en cuanto a personal capacitado, espacio físico adecuado, aptitud y adecuado almacenamiento de los insumos, mantenimiento de equipos, manejo de datos, etc. Cabe destacar que una vez que un laboratorio ha incorporado un determinado ensayo, debe respetar estrictamente las instrucciones del fabricante y cualquier cambio introducido requerirá una nueva validación antes de su implementación^{35, 76, 77}.

En conclusión, dado que la infección persistente por los VPH-AR ha sido firmemente establecida como causa necesaria para el desarrollo del CCU, la detección de estos virus ha adquirido gran importancia, pudiendo aportar grandes beneficios a las estrategias aplicadas al

tamizaje, triaje, discernimiento de ASCUS y seguimiento post-tratamiento.

La cantidad y variedad de técnicas para la detección de VPH en la práctica clínica ha crecido de manera notable; sin embargo, solo una minoría de ellas tiene documentada la validación clínica correspondiente, que acredite su uso según las indicaciones específicas. En nuestro país, hasta la fecha solo están disponibles dos técnicas validadas para uso clínico: la captura de híbridos y el sistema Cobas.

El desarrollo de nuevos marcadores biológicos asociados a la progresión neoplásica (basados o no en VPH), continúa siendo un campo de gran interés, ya que podrían identificar nuevos blancos para uso clínico.

En resumen, un amplio espectro de pruebas comerciales de VPH está disponible, con diferentes características técnicas y propiedades analíticas y de utilidad clínica. Se espera que estas pruebas sean utilizadas en tamizaje primario, triaje para selección de tratamiento y seguimiento de mujeres tratadas. Esto brinda un escenario sumamente promisorio en cuanto a las posibilidades de mejorar el manejo clínico de las pacientes con patología cervical y la prevención del CCU. Sin embargo, los profesionales médicos y las autoridades sanitarias deben tener muy en cuenta la elección del ensayo, no solo los aspectos económicos y prácticos, sino fundamentalmente si la prueba está validada clínicamente para el propósito de uso. Asimismo, deben también informarse sobre las pautas de control de calidad seguidas en los laboratorios que llevan a cabo las técnicas.

Las nuevas tecnologías imponen desafíos renovados. Se requiere de un esfuerzo en la formación de los profesionales de la salud en el uso e interpretación de los resultados de las pruebas de VPH, para que su implementación de acuerdo a las indicaciones establecidas en base a la evidencia científica brinde el máximo beneficio y evite los efectos adversos de una aplicación clínica inadecuada.

Agradecimientos: La autora agradece a Jorge A. Basiletti por su ayuda en el diseño de las figuras y la tabla.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar.

Bibliografía

1. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401: 70–9.
2. zur Hausen H. Papillomavirus infection- a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288, F55-78.
3. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F55-70.
4. Crow JM. HPV: The global burden. *Nature* 2012; 488: S2-3.
5. Ministerio de Salud de la Nación, Instituto Nacional del Cáncer, *Dirección de Estadísticas e Información de Salud*. Lineamientos Técnicos de la Vacunación contra VPH, 2011. En: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/>

- inmunizaciones/equipos-de-salud/lineamientos-tecnicos-vph-2011.pdf; consultado 05/03/2013.
6. Centers for Diseases Control and Prevention. HPV and Cancer. En: <http://www.cdc.gov/hpv/cancer.html>; consultado 27/03/2013.
 7. Harper DM, Williams KB. Prophylactic HPV vaccines: current knowledge of impact on gynecologic premalignancies. *Discov Med* 2010; 10: 7-17.
 8. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997; 102 (5, Suppl 1): 3-8.
 9. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.
 10. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 2009; 4: 8.
 11. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens - Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009; 10: 321-2.
 12. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010; 202: 1789-99.
 13. Matos E, Loria D, Amestoy GM, et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concordia, Argentina: a population-based study. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 593-9.
 14. Deluca GD, Basiletti J, González JV, Díaz Vásquez N, Lucero RH, Picconi MA. Human papilloma virus risk factors for infection and genotype distribution in aboriginal women from Northern Argentina. *Medicina (B Aires)* 2012; 72: 461-6.
 15. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1157-64.
 16. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89: 101-5.
 17. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. Type-specific HPV prevalence in cervical cancer and high-grade lesions in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e25493.
 18. Picconi MA, Alonío LV, García Carrancá A, et al. Molecular variants of human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 in adenocarcinomas of the cervix. *Medicina (B Aires)* 2000; 60: 889-94.
 19. Quint W, Jenkins D, Molijn A, et al. One virus, one lesion - individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol* 2012; 227: 62-71.
 20. Schiffman M, Castle PE. The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med* 2005; 353: 2101-4.
 21. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370: 890-907.
 22. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995; 64: 1-378.
 23. McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 459-66.
 24. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
 25. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV detection methods. *Dis Markers* 2007; 23: 273-81.
 26. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, 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.
 27. Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer CJLM. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *AP-MIS* 2010; 118: 520-8.
 28. Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2012; 49: 117-36.
 29. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F100-6.
 30. Eklund C, Zhou T, Dillner J. WHO Human Papillomavirus Laboratory Network. Global proficiency study of human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4147-55.
 31. Kinney W, Stoler MH, Castle PE. Special commentary: patient safety and the next generation of HPV DNA tests. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 193-9.
 32. Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated tests. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 335-7.
 33. Arbyn M, Ronco G, Cuzick J, Wentzensen N, Castle PE. How to evaluate emerging technologies in cervical cancer screening? *Int J Cancer* 2009; 125: 2489-96.
 34. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3): S78-89.
 35. Cuschieri K. Human papillomavirus testing: the challenges of picking the right tools for the job. *Exp Rev Obstet Gynecol* 2011; 6: 643-53.
 36. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results. A meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 648-59.
 37. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol* 2009; 45 (Suppl. 1): S3-12.
 38. Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 441-50.
 39. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008; 26 (Suppl 10): K29-41.
 40. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz, et al. New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine* 2012; 30(S5): F107-16.
 41. Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A. Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn Cytopathol* 2010; 38: 618-23.
 42. Ministerio de Salud de la Nación, Instituto Nacional del Cáncer, Programa Nacional de Prevención de Cáncer Cérvico-Uterino. Guía para la utilización de la prueba de VPH como método de tamizaje primario en la Argentina. Diciembre 2011.
 43. Schweizer J, Lu PS, Mahoney CW, et al. Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4646-8.
 44. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available tests for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Exp Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 1139-62.
 45. Arbyn M, Dillner J, Schenck U, et al. Methods for screening and diagnosis. In: Arbyn M, Anttila A, Jordan J, et al., editors. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. 2nd edition Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2008. p 69-152.
 46. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding

- human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F88-99.
47. Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 908-14.
 48. Einstein MH, Martens MG, Garcia FA, et al. Clinical validation of the Cervista HPV HR and 16/18 genotyping tests for use in women with ASC-US cytology. *Gynecol Oncol* 2010; 118: 116-22.
 49. Belinson JL, Wu R, Belinson SE, et al. A population-based clinical trial comparing endocervical high-risk HPV testing using hybrid capture 2 and Cervista from the SHENCCAST II Study. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 790-5.
 50. Qiao YL, Sellors JW, Eder PS, et al. A new HPV-DNA test for cervical-cancer screening in developing regions: a cross-sectional study of clinical accuracy in rural China. *Lancet Oncol* 2008; 9: 929-36.
 51. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, 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.
 52. Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL, ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) HPV Study Group. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 468-75.
 53. Castle PE, Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 880-90.
 54. Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) Study Group. Evaluation of HPV16 and HPV18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 578-86.
 55. Heideman, DAM, Hesselink AT, Berkhof J, et al. Clinical Validation of the cobas 4800 HPV Test for Cervical Screening Purposes. *J Clin Microbiol* 2011, 49: 3983-5.
 56. Cox JT, Castle PE, Behrens CM, Sharma A, Wright TC Jr, Cuzick J; Athena HPV Study Group. Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 208: 184.e1-184.e11.
 57. Cuzick J, Ambroisine L, Cadman L, et al. Performance of the Abbott RealTime high-risk HPV test in women with abnormal cervical cytology smears. *J Med Virol* 2010; 82: 1186-91.
 58. Huang S, Erickson B, Tang N, et al. Clinical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal cytology. *J Clin Virol* 2009; 45 (Suppl. 1): S19-23.
 59. Poljak M, Ostrbenk A, Seme K, et al. Comparison of clinical and analytical performance of the Abbott Realtime High Risk HPV test to the performance of hybrid capture 2 in population-based cervical cancer screening. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1721-9.
 60. Carozzi FM, Burroni E, Bisanzì S, et al. Comparison of clinical performance of Abbott RealTime High Risk HPV test with that of hybrid capture 2 test in a screening setting. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1446-51.
 61. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2536-45.
 62. Burger EA, Kornor H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 430-8.
 63. Getman D, Aiyer A, Dockter J, Giachetti C, Zhang F, Ginocchio CC. Efficiency of the APTIMA HPV Test for detection of HPV RNA and DNA targets. *J Clin Virol* 2009; 45 (Suppl. 1): S49-54.
 64. Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, et al. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *Int J Cancer* 2011; 129: 691-701.
 65. Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjanen K, Smith JS. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (The FASE Study). *Gynecol Oncol* 2012; 125: 175-80.
 66. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer* 2012; 130: 602-10.
 67. Boulet GA, Micalessi IM, Horvath CA, Benoy IH, Depuydt CE, Bogers JJ. Nucleic acid-sequence based amplification test for HPV mRNA detection and typing: evidence for DNA amplification. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2524-9.
 68. Hovland S, Arbyn M, Lie AK, et al. A comprehensive evaluation of the accuracy of cervical pre-cancer detection methods in a high-risk area in East Congo. *Br J Cancer* 2010; 102: 957-65.
 69. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, et al. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA test in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2779-85.
 70. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, et al. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3033-42.
 71. Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, et al. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA test as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2643-50.
 72. Sorbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. Triage of women with low-grade cervical lesions - HPV mRNA testing versus repeat cytology. *PLoS One* 2011; 6: e24083.
 73. Sorbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. HPV E6/E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy. *PLoS One* 2011; 6: e26022.
 74. Tabrizi SN. Quality assessment for human papillomavirus testing. *Sex Health* 2010; 7: 335-7.
 75. WHO_HPV_LabNet. En: www.who.int/biologicals/areas/humanpapillomavirus/WHO_HPV_LabNet/en/index.html; consultado 05/03/2013.
 76. Fagan EJ, Moore C, Jenkins C, Rossouw A, Cubie HA, James VL. External quality assessment for molecular detection of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2010; 48: 251-4.
 77. Unger ER, Dillner J, editors. Human Papillomavirus Laboratory Manual. 1st Edition Geneva: World Health Organization; 2009. En: <http://www.who.int/immunization/documents/en/>; consultado 01/05/12.