# ANÁLISIS DEL GENOTIPADO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH16, VPH18 Y VPH OTROS DE ALTO RIESGO) EN LESIONES PRE-NEOPLÁSICAS DE CUELLO DE ÚTERO

*Tomás García Lozano*[a] *y Rafael Lorente Gual*[b]

Fechas de recepción y aceptación: 20 de febrero de 2015 y 23 de marzo de 2015

*Resumen*: *Introducción*: El virus del papiloma humano (VPH) está implicado en patología tumoral femenina como es el cáncer de cuello de útero. La utilidad de las técnicas moleculares de detección del virus del papiloma humano (VPH) como cribado oportunista o no forman parte de los esquemas diagnósticos y terapéuticos de las sociedades oncológicas y ginecológicas más importantes. *Material y métodos*: Se ha realizado un estudio retrospectivo de 600 citologías desde enero de 2013 hasta octubre de 2014. El método utilizado fue la PCR a tiempo real del cobas® 4800 System. El objetivo de nuestro estudio ha sido analizar la relación e implicación de las lesiones pre-tumorales (ASC-US, LSIL, HSIL, etc.), los resultados de la PCR (positiva o negativa), el tipo de virus (VPH16, VPH18 y VPH Otros) y la frecuencia de edades. *Resultados*: Del total de 600 citologías, 228 fueron positivas (PCR positiva) y 372 negativas (PCR negativa). La descripción del tipo de lesiones se detalla en la tabla 1. En lesiones con VPH16 (+): 26 fueron ASC-US, 7 normales, 7 inflamación, 7 LSIL y otros sin interés; en cuanto a lesiones con VPH18 (+): 6 fueron normales, 2 ASC-US y el resto sin importancia. Y con respecto a VPH Otros genotipos (+): 46 fueron ASC-US, 30 LSIL, 31 normales, 19

[a] Servicio de Análisis Clínicos y Microbiología, Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO). Valencia. Profesor asociado de Microbiología, Departamento de Fisioterapia y Podología, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Valencia.

Correspondencia: Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO, Servicio de Análisis Clínicos y Microbiología). Calle Gregorio Gea, 31. 46009 Valencia. España.

E-mail: tglmicro@gmail.com.

[b] Profesor titular, Departamento de Fisioterapia y Podología, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Valencia.

inflamación y el resto de menor interés. En cuanto a la edad, se detectó un predominio de VPH16 (+) entre los 38-40 años y VPH Otros entre los 34-36 años o 40-44 años. En los resultados de lesiones globales, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$ entre las edades indicadas y diagnóstico de PCR (+)-VPH16/VPH Otros, así como las co-infecciones por varios genotipos virales. *Conclusiones*: El cribado del VPH de alto riesgo y su genotipado es fundamental para el diagnóstico y tratamiento. Los métodos moleculares aprobados por la FDA y concretamente el cobas® 4800 System ofrecen excelentes garantías para los objetivos buscados (genotipado y cribado). Sorprende la alta prevalencia de VPH para Otros virus de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) entre los 34-36/40-44 años y alta frecuencia de ASC-US con PCR positiva. En función de los resultados obtenidos, consideramos que es necesario realizar técnicas de biología molecular previas o de forma colateral a la observación de citologías y no a la inversa.

*Palabras clave*: virus del papiloma humano (VPH), genotipado, lesiones pre-tumorales.

*Abstract*: *Introduction*: The human papillomavirus (HPV) is involved in female tumor pathology such as cancer of the cervix. The usefulness of molecular techniques of detecting human papillomavirus (HPV) as opportunistic screening or not, viruses are part of the diagnostic and therapeutic regimens of the most important oncology and gynecological societies. *Material and methods*: there has been realized a retrospective study of 600 cytologies from January 2013 until October, 2014. The used method was the PCR in time royal of the cobas® 4800 System. The aims of our study have been to analyze the relation and implication of the pre-neoplasics injuries (ASC-US, LSIL, HSIL…), the results of the PCR (positive or negative), the type of virus (VPH16, VPH18 and different VPH) and the frequency of ages. *Results*: of the total of 600 cytologies, 228 were positive (PCR positive) and 372 negative (PCR negative). The description of the type of injury is detailed in Table 1. In lesions with HPV16 (+): ASC-US were 26, 7 standard, 7 inflammation, 7 LSIL and other uninteresting; for injury with HPV18 (+): 6 were normal, 2 ASC-US and the rest unimportant; and with respect to other HPV genotypes (+): 46 were ASC-US, 30 LSIL, 31 normally, 19 inflammation and other minor interest. As for age, predominance of HPV16 (+) between 38-40 years and HPV Other between 34-36 or 40-44 years was detected. Co-infections by various viral genotypes HPV16 / Other HPV, and - on the results of global injuries, differences were statistically significant at $p <0.05$ between the ages indicated and diagnostic PCR (+). *Conclusions*: their genotyping and high-risk HPV screening is essential for diagnosis and treatment. Molecular methods approved by the FDA and specifically the cobas® 4800

System offer excellent warranties for the desired objectives (genotyping and screening). Surprised the high prevalence of HPV for other high-risk virus (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) between 34-36/40-44 years and high frequency of ASC-US with positive PCR. Depending on the results, we believe that it is necessary to perform molecular biology techniques previous or collateral form of Cytology observation and not vice versa.

*Keywords*: Human Papillomavirus (HPV), gentyping, pre-tumoral lesions.

## Introducción

El cáncer de cuello de útero es la tercera y cuarta causa de incidencia y mortalidad por cáncer en mujeres de todo el mundo[1] y responsable de un 5,2% de todos los tumores en humanos[2].

El cribado con plataformas de biología molecular en determinados periodos de edad y la implantación de la vacunación frente al VPH han mejorado las perspectivas de vida saludable. Con todo ello, y junto a la citología, se ha conseguido reducir hasta un 70% la incidencia en cáncer de cuello de útero (CCU). Multitud de estudios han aportado sólidas evidencias de la implicación del virus del papiloma humano (VPH) causante de CCU, sin embargo debemos considerar que muchas de las infecciones son mixtas (co-infecciones) o simplemente transitorias.

Los algoritmos de cribado auspiciados por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (SEAP) y la Sociedad Española de Citología (SEC) proponen las estrategias de cribado según los rangos de edad. En este algoritmo incluyen el cribado de detección de VPH entre los 30 y 65 años, estableciendo diferentes estrategias como son la detección de VPH y citología conjunta cada cinco años o citología exclusivamente cada tres años[3].

El cáncer de cuello de útero es una enfermedad letal en mujeres, de hecho el 83% se produce en países en vías de desarrollo[4]. En países desarrollados o industrializados los programas de cribado, oportunistas o no, permiten detectar y tratar las lesiones adecuadamente, reduciendo drásticamente la incidencia y mortalidad de esta patología.

La reducida sensibilidad de la citología ha hecho necesario la inclusión de plataformas de detección de VPH mediante técnicas de biología molecular tanto como co-test o como test inicial. De hecho, gracias a la actualización de los datos disponibles se han inferido resultados muy prometedores, principalmente, cuando se combina la citología con la detección de VPH mediante técnicas de biología molecular[5], aumentando considerablemente la sensibilidad, pero obteniendo discretos descensos de especificidad cuando solo se realiza la detección de VPH inicialmente o exclusivamente.

Actualmente, la importancia de su diagnóstico y el conocimiento de su etiopatogenia, así como de su oncogénesis es fundamental para obtener un conocimiento aproximado de las co-infecciones y reactivaciones virales en lesiones pre-tumorales. Desde 1980 la investigación ginecológica y virológica ha sido primordial y de enorme trascendencia clínica.

Las técnicas de cribado como la citología y el test de Papanicolaou han permitido reducir la mortalidad, pero se caracterizan por tener una baja especificidad. Gracias a la implantación de los tests moleculares en el diagnóstico viral se ha aumentado la sensibilidad diagnóstica. Se ha documentado que la utilización de ambas técnicas a la vez permite aumentar los intervalos de control a tres años con buenos resultados (por ejemplo, ensayo de cohortes o *Kaiser Permanent Northern California*). Y actualmente podemos afirmar el protagonismo que van a desempeñar nuevos biomarcadores, como la detección de ARNm de VPH[1] (carga viral) u otros como la p16-INK4a[6], Ki-67, MCM2 y TOP2a[1].

Se sabe que el 10% de las mujeres infectadas por el VPH de tipo 16 o 18 desarrollan H-SIL (CIN3) en los 3 años siguientes a la infección[7] y existe una fuerte relación entre infección del VPH tipo 16 y carcinoma de células escamosas (CCS) o entre VPH tipo 18 y adenocarcinoma de cuello de útero[8,9].

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Es icosaédrico de 72 capsómeros y posee ADN circular de doble cadena. Presenta gran diversidad genética y se clasifica en 120 genotipos distintos. La capacidad oncogénica del virus reside en las regiones E6 y E7 de su genoma. Son capaces de inhibir a las proteínas anti-oncogénicas Rb-p53 y dan lugar a la transformación neoplásica e inhibición de la apoptosis celular en procesos tumorales[10]. Actualmente la infección por el VPH de alto riesgo en cuello de útero es necesaria para el desarrollo de cáncer pero resulta a veces insuficiente, dado que es necesario que intervengan otros factores como el consumo de tabaco[11], inmunodepresión[12], anticonceptivos orales[13] o la coinfección con otros virus[14]. También se ha planteado la existencia de cáncer de cuello de útero sin asociación con VPH[15, 16].

Antes de plantear nuestro estudio, debemos conocer el tipo de lesiones pre-neoplásicas que están presentes con las infecciones del papilomavirus humano (VPH). Según la terminología de Bethesda, se clasifican en lesiones escamosas intraepiteliales de bajo riesgo (L-SIL), de alto riesgo (H-SIL) y otras[17].

Nuestro objetivo ha sido conocer la prevalencia de las infecciones por el VPH16, VPH18 y VPH Otros (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) de alto riesgo oncológico en distintas edades y en distintos tipos de lesiones pre-tumorales.

## Material y métodos

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 600 citologías desde enero de 2013 hasta octubre de 2014 en un centro monográfico de cáncer de menos de 200 camas. El criterio de inclusión del estudio ha sido el análisis viral de todas las muestras remitidas desde el servicio de ginecología o aquellas citologías que se derivaron directamente desde anatomía patológica por ser lesiones de significado incierto (ASC-US) o pre-neoplásicas. Se ha incluido un estudio pormenorizado de las citologías positivas o solicitadas por el servicio de ginecología.

### *Población*

Se evaluaron retrospectivamente 600 citologías remitidas entre enero de 2013 y octubre de 2014. El rango de edad de estudio está comprendido entre los 16 y 86 años de edad (media de edad 51 años), no pertenecientes a un cribado poblacional de rutina (cribado oportunista).

### *Examen ginecológico*

Se realizaron citologías de todas las pacientes. Se extendieron tres portaobjetos de tres muestras: vagina, exocérvix y endocérvix. Se tiñeron con la técnica de Papanicolaou. Además de ser recogido exudado endocervical con cepillo para estudios virales.

Los resultados de la citología se clasificaron en:

Según Bethesda en ASCUS (células escamosas atípicas de significado incierto), ASC-H (células escamosas atípicas que no pueden excluirse de una anormalidad intraepitelial escamosa de alto grado), AGC "células glandulares atípicas", AIS "adenocarcinoma endocervical in situ", L-SIL "lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (CIN 1)", H-SIL "lesión escamosa intraepitelial de alto grado (CIN 2 y CIN 3)" y SCC "carcinoma escamoso (in situ o invasivo)".

### *Detección de VPH*

Se realizaron 600 citologías líquidas (Cell Collection Media®, Roche). El método empleado fue el cobas® 4800 System. Es un sistema de PCR a tiempo real totalmente

automatizado que detecta VP16, VPH18 y VPH Otros (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

Los resultados se clasificaron en función del tipo de lesión pre-patológica o pre-neoplásica. Las variables que se estudiaron fueron: edad, diagnóstico patológico, PCR (+) o PCR (-), PCR (+) para el genotipo VPH 16, PCR (+) para el genotipo VPH 18 y PCR (+) para otros genotipos VPH (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

### *Análisis estadístico*

Las mediciones se realizaron sobre 602 individuos de una muestra aleatoria (600 citologías), sobre los que se midieron: edad, tipo de lesión (diagnóstico anátomo-patológico) y tipo de infección viral. De estas variables solo la edad es presumiblemente continua, por tanto el análisis utiliza las herramientas del análisis de factores categóricos para obtener conclusiones adecuadas. De modo análogo al caso univariado, el resumen básico de la información de un grupo de dos o más variables consiste en la distribución conjunta de frecuencias de estas, la cual se basa en el conteo del número de casos (frecuencias) que presentan las distintas combinaciones de valores que a nivel empírico se hayan dado para esas variables. Las modalidades de una distribución conjunta representarán no los valores de una variable concreta, sino todas las posibles combinaciones de los valores de las variables que se consideren, excepto aquellas combinaciones que no se hayan presentado a nivel empírico y que por tanto no tiene sentido incluir en la distribución de frecuencias. Sin embargo, como se verá en breve, en este caso no es necesario considerar un análisis de correspondencia múltiple pues la naturaleza de los objetivos no lo hace necesario. El manejo de categorías también hace innecesario hacer pruebas de normalidad multivariada[18].

## Resultados

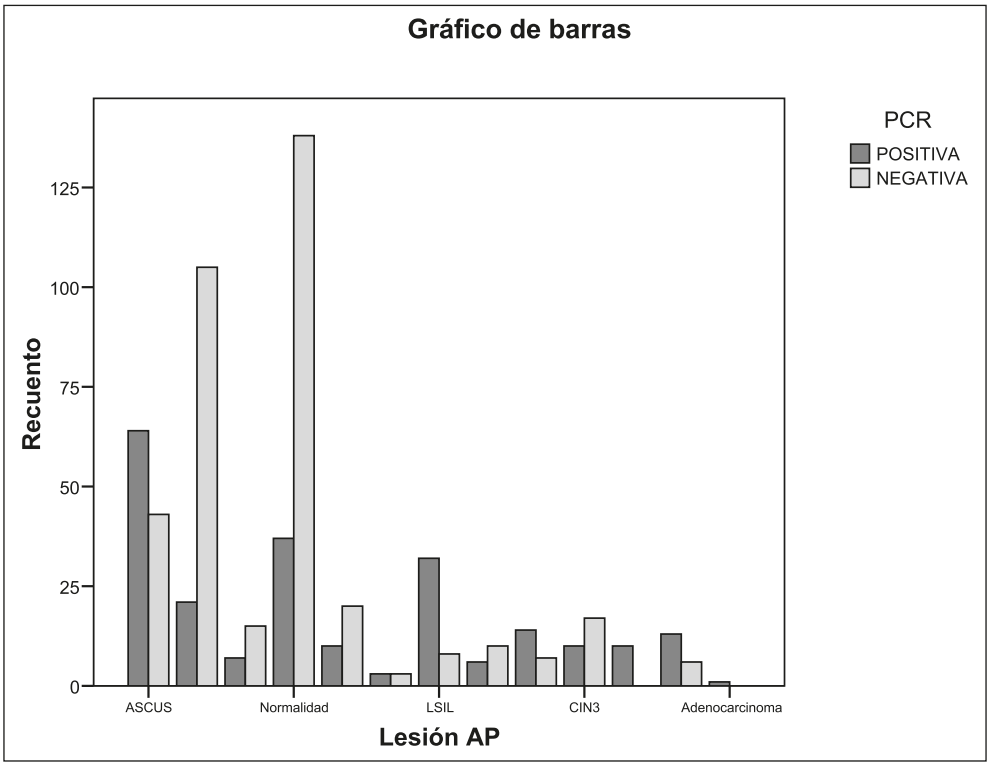
Durante el periodo de enero de 2013 a octubre de 2014. Del total de 600 citologías, 228 fueron positivas (PCR positiva) y 372 negativas (PCR negativa). En la descripción del tipo de lesiones y PCR positiva para VPH, observamos que del total de las PCR positivas los datos más representativos fueron: 64 fueron descritas como ASC-US, 21 inflamación, 37 normales, 32 LSIL y 14 CIN2. En la columna de las citologías PCR

negativas, los datos más representativos fueron: 43 ASC-US, 105 inflamación, 138 normales, 20 vaginitis bacteriana, 10 CIN1 y 17 CIN3 (tabla 1 y gráfico 1).

TABLA 1
*Tipo de lesiones y PCR*

| POSITIVA | | PCR | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | NEGATIVA | POSITIVA | |
| Lesión AP | ASCUS | 64 | 43 | 107 |
| | Inflamación | 21 | 105 | 126 |
| | Vaginitis por Candida spp. | 7 | 15 | 22 |
| | Normalidad | 37 | 138 | 175 |
| | Vaginosis bacteriana | 10 | 20 | 30 |
| | Hiperqueratosis | 3 | 3 | 6 |
| | LSIL | 32 | 8 | 40 |
| | CIN1 | 6 | 10 | 16 |
| | CIN2 | 14 | 7 | 21 |
| | CIN3 | 10 | 17 | 27 |
| | HSIL | 10 | 0 | 10 |
| | Nada descrito | 13 | 6 | 19 |
| | Adenocarcinoma | 1 | 0 | 1 |
| | Total: | 228 | 372 | 602* |

GRÁFICO 1
*Tipo de lesiones y PCR*

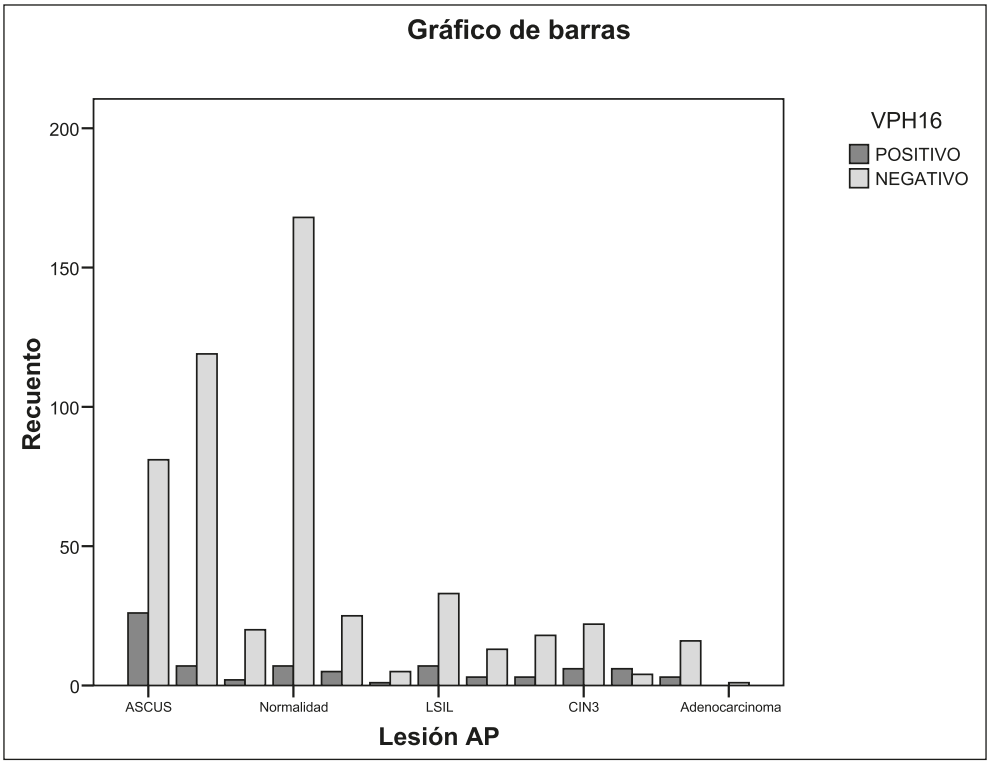


En lesiones con VPH16 (+): 26 fueron ASC-US, 7 inflamación, 7 normales, 7 LSIL y otros sin interés (tabla 2 y gráfico 2).

TABLA 2
*Tabla de contingencia entre tipo de lesiones y VPH16*

| POSITIVO | | VPH16 | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | |
| Lesión AP | ASCUS | 26 | 81 | 107 |
| | Inflamación | 7 | 119 | 126 |
| | Vaginitis por *Candida* spp. | 2 | 20 | 22 |
| | Normalidad | 7 | 168 | 175 |
| | Vaginosis bacteriana | 5 | 25 | 30 |
| | Hiperqueratosis | 1 | 5 | 6 |
| | LSIL | 7 | 33 | 40 |
| | CIN1 | 3 | 13 | 16 |
| | CIN2 | 3 | 18 | 21 |
| | CIN3 | 6 | 22 | 28 |
| | HSIL | 6 | 4 | 10 |
| | Nada descrito | 3 | 16 | 19 |
| | Adenocarcinoma | 0 | 1 | 1 |
| | Total | 76 | 525 | 601 |

GRÁFICO 2
*Tipo de lesiones y PCR VPH positiva*

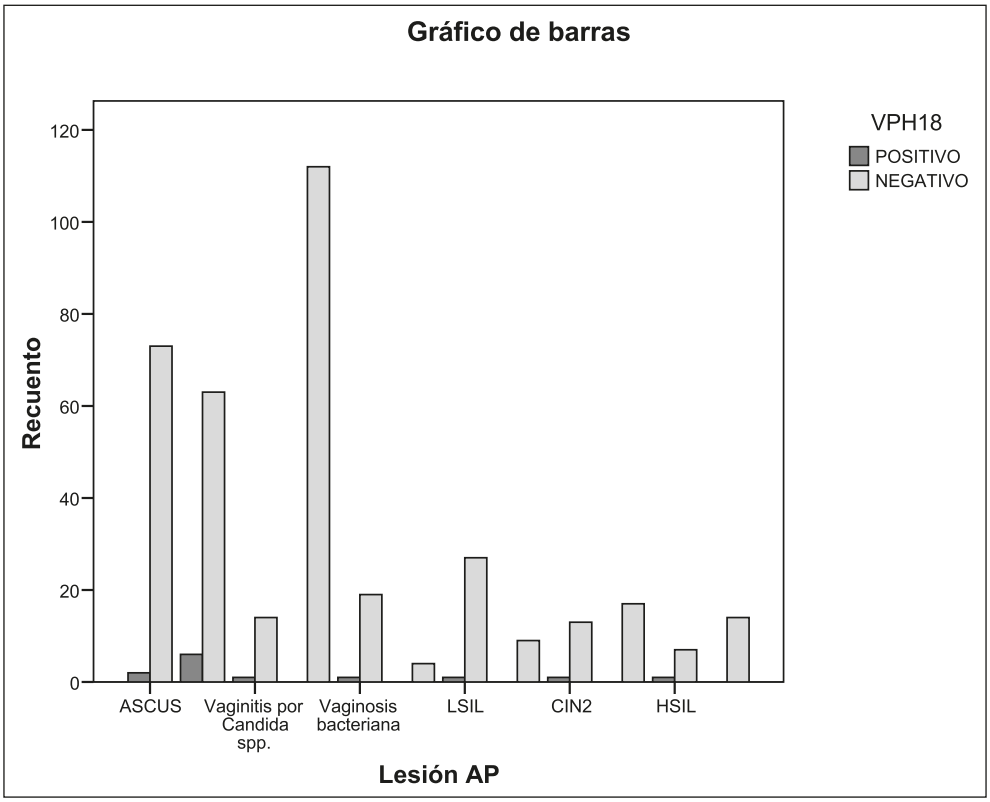


En cuanto a lesiones con VPH18 (+): 2 ASC-US, 6 inflamación y el resto sin importancia (tabla 3 y gráfico 3).

TABLA 3
*Tabla de contingencia entre lesiones y VPH18*

| POSITIVO | | VPH18 | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | |
| Lesión AP | ASCUS | 2 | 73 | 75 |
| | Inflamación | 6 | 63 | 69 |
| | Vaginitis por *Candida* spp. | 1 | 14 | 15 |
| | Normalidad | 0 | 112 | 112 |
| | Vaginosis bacteriana | 1 | 19 | 20 |
| | Hiperqueratosis | 0 | 4 | 4 |
| | LSIL | 1 | 27 | 28 |
| | CIN1 | 0 | 9 | 9 |
| | CIN2 | 1 | 13 | 14 |
| | CIN3 | 0 | 17 | 17 |
| | HSIL | 1 | 7 | 8 |
| | Nada descrito | 0 | 14 | 14 |
| | Total | 13 | 372 | 385 |

GRÁFICO 3
*Tipo de lesiones y PCR VPH18 positiva*

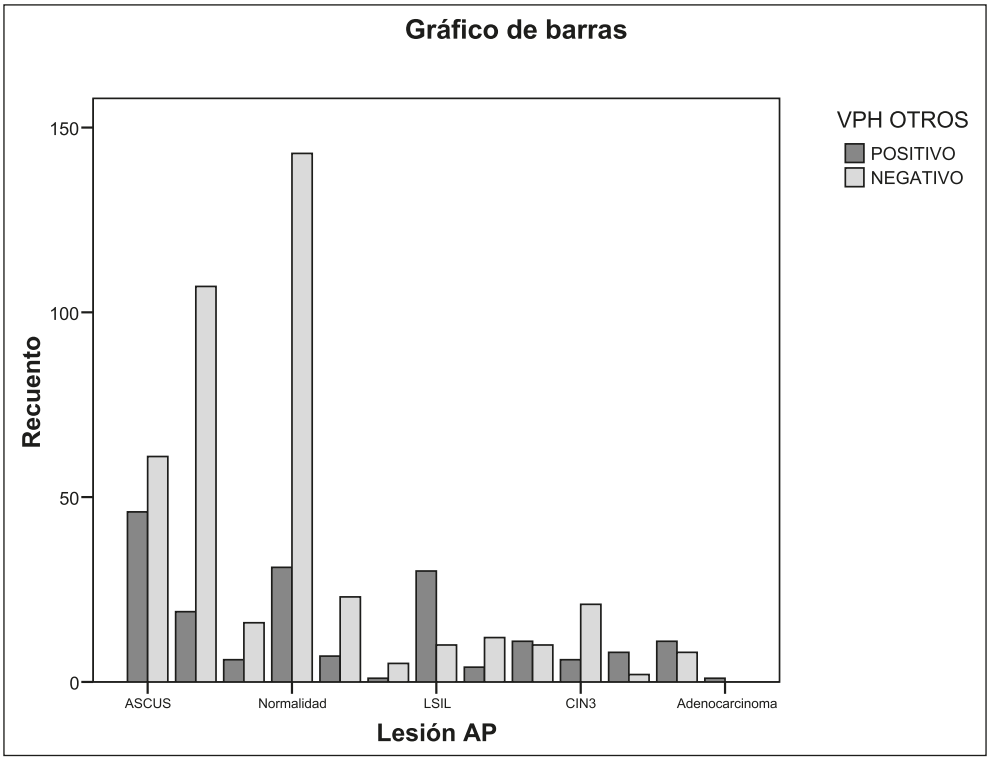


Con respecto a VPH Otros genotipos (+): 46 fueron ASC-US, 30 LSIL, 31 normales, 19 inflamación y el resto de menor interés (tabla 4 y gráfico 4).

TABLA 4
*Tabla de contingencia entre tipo de lesiones y VPH Otros*

| POSITIVO | | VPH OTROS | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | |
| Lesión AP | ASCUS | 46 | 61 | 107 |
| | Inflamación | 19 | 107 | 126 |
| | Vaginitis por *Candida* spp. | 6 | 16 | 22 |
| | Normalidad | 31 | 143 | 174 |
| | Vaginosis bacteriana | 7 | 23 | 30 |
| | Hiperqueratosis | 1 | 5 | 6 |
| | LSIL | 30 | 10 | 40 |
| | CIN1 | 4 | 12 | 16 |
| | CIN2 | 11 | 10 | 21 |
| | CIN3 | 6 | 21 | 27 |
| | HSIL | 8 | 2 | 10 |
| | Nada descrito | 11 | 8 | 19 |
| | Adenocarcinoma | 1 | 0 | 1 |
| | Total | 181 | 418 | 599 |

GRÁFICO 4
*Tipo de lesiones y PCR VPH Otros positiva*



En cuanto a la edad, se detectó un predominio de VPH16 (+) entre los 38-40 años (gráfico 5), en VPH18 no presentaron datos significativos (gráfico 6) y VPH Otros entre los 34-36 años o 42-44 años (gráfico 7). En los resultados de lesiones globales, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0,05$ entre las edades indicadas y diagnóstico de PCR (+)-VPH16/VPH Otros, así como las co-infecciones por varios genotipos virales ($p < 0,05$).

GRÁFICO 5
*Periodos de edad en infección por VPH16*

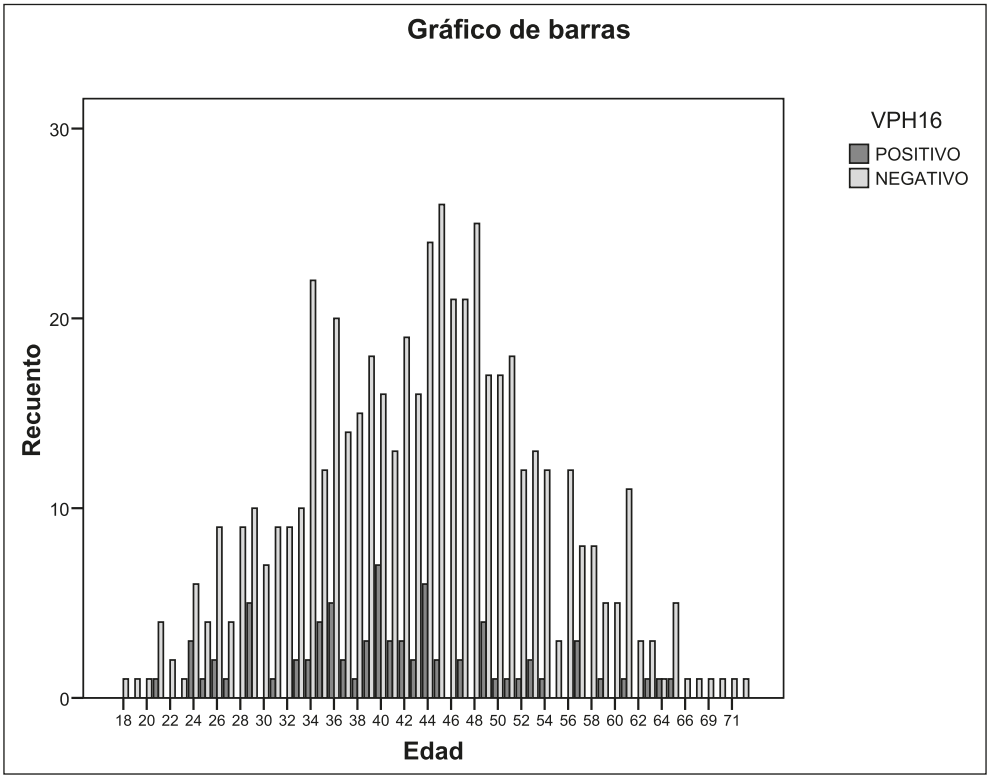


GRÁFICO 6
*Periodos de edad en infección por VPH18*

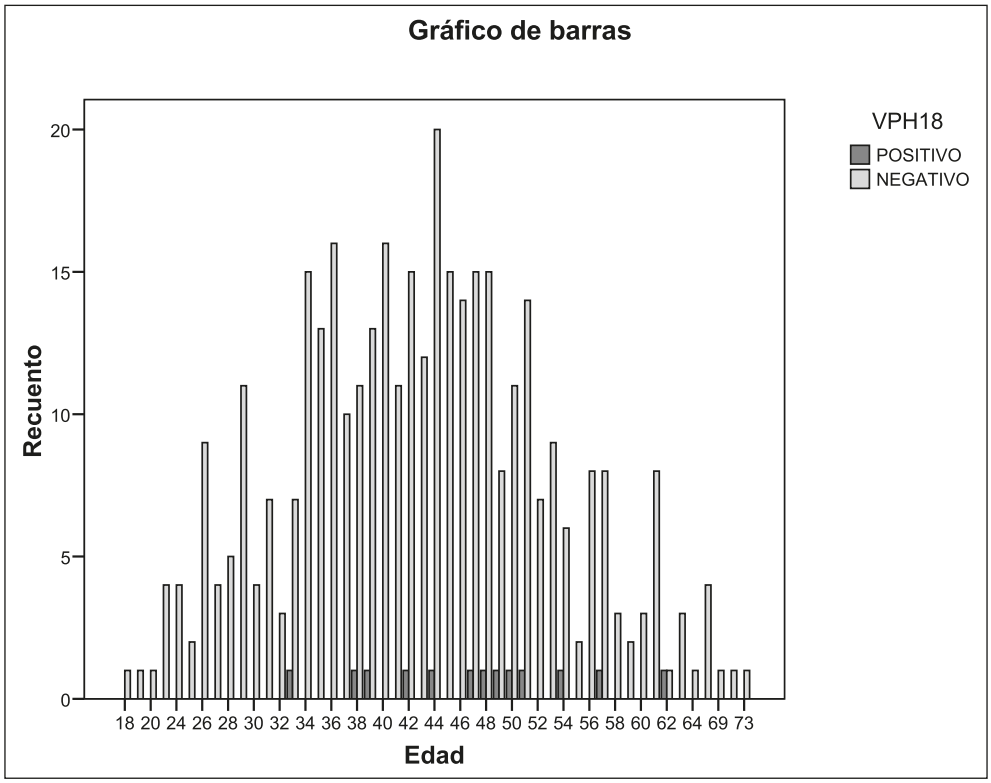
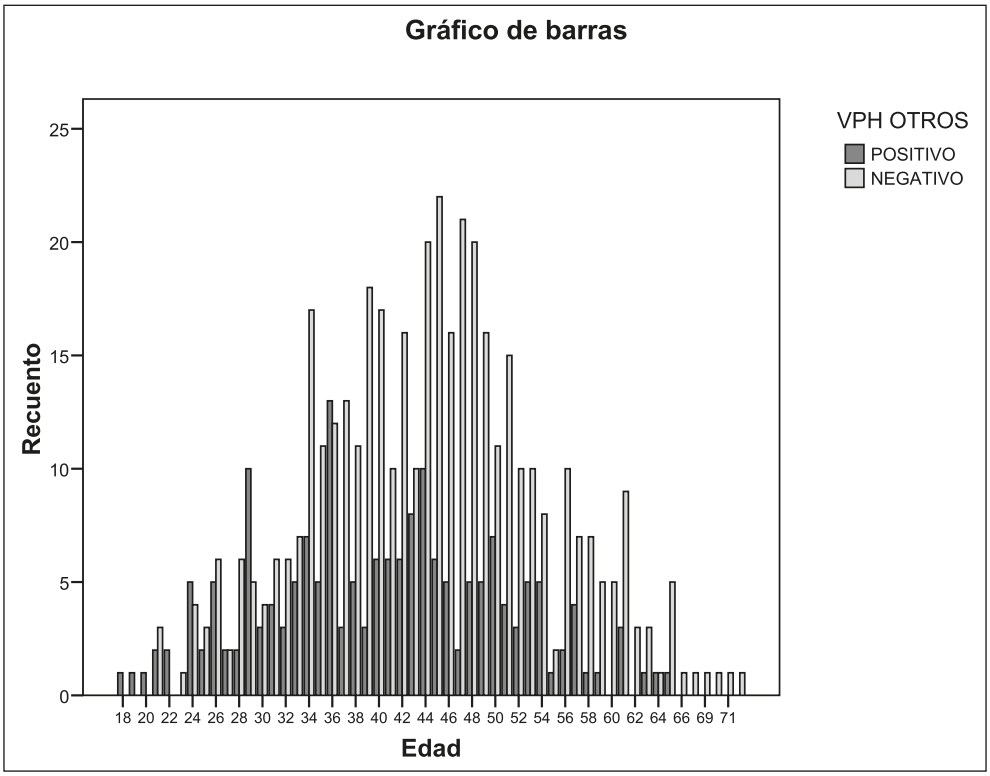


GRÁFICO 7
*Periodos de edad en infección por Otros VPH*



*A. ¿En qué periodo de edad es más prevalente la infección por el VPH16, VPH18 y VPH Otros?*

Como el valor-P de la tabla de análisis de desviaciones es menor de 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95%. Se platea una prueba de bondad de ajuste para determinar si la función logística se ajusta adecuadamente a los datos observados. Para calcular la edad de mayor prevalencia basta con hallar el predominio de edad del grupo de positivos, que es de 40,76 años en VPH16 (gráfico 5) y 44,35 años para VPH18 (gráfico 6) y VPH Otros (gráfico 7).

*B. ¿En qué tipo de lesiones pre-tumorales (AP) es más prevalente VPH16, VPH18 y VPH Otros?*

Se utiliza Chi-cuadrado y el valor es $P$ = 0,00, esto implica que el valor-P es menor de 0,05, por lo tanto la presencia o ausencia de VPH16 están relacionadas con el tipo de lesión particular con una confiabilidad de 95% y se concluye que el VPH16 es más prevalente en lesiones ASC-US con una prevalencia aproximada del 4,80% (29 casos de 182) (gráfico 2).

Se aplica la misma técnica de análisis a través de la construcción de factores como en VPH18, obteniendo un valor-P de 0,471, lo que indica que VPH18 pudiera no tener relación con ningún tipo de lesión en concreto (gráfico 3).

Con respecto a VPH Otros, el valor-P para la prueba de la independencia es de P = 0,000, por lo tanto la presencia o ausencia de VPH Otros está relacionada con un nivel de confiabilidad del 95%, con lesiones ASC-US con una prevalencia aproximada de 7,4% (46 de 182 casos), seguida por lesiones dentro de la normalidad con una prevalencia del 5,15% (31 de 182 casos) y por LSIL con una prevalencia del 4,98% (30 de 182 casos) (gráfico 4).

## Discusión

El estudio del genotipado del VPH en un hospital oncológico es fundamental y la detección del VPH en lesiones pre-tumorales o pre-neoplásicas es prioritaria. El estudio del VPH de alto riesgo como estrategia de cribado es importante, independientemente del método empleado aprobados por la FDA (Hybrid Capture® 2 de QIAGEN, Cervista® HPV HR Test de Hologic, Cobas® 4800 HPV Test de Roche y Aptima® HPV Test de Gen-Probe). Es útil para el estudio microbiológico y virológico, así como para el

seguimiento del desarrollo de la enfermedad y como estrategia de implantación o diseño de vacunas.

La presencia de las infecciones múltiples o coinfecciones por VPH de alto riesgo en multitud de lesiones (H-SIL, L-SIL, ASC-US) es interesante por el hecho de que las infecciones múltiples por VPH16, VPH18 y VPH Otros se presentan con elevada frecuencia en lesiones de significado incierto (ASC-US) o simplemente en citologías negativas.

En un estudio se describió cómo el aclaramiento de VPH-AR se relacionaba directamente con la regresión de las lesiones citológicas[19] y en otro estudio, del mismo autor, se analiza pormenorizadamente caso por caso y se demuestra que la persistencia de la infección era un requisito indispensable para el desarrollo tumoral (CIN3)[20].

Con motivo de los métodos moleculares, existe suficiente evidencia de que las técnicas de co-test (detección de VPH y citología simultáneamente) o detección de VPH como cribado inicial detectan un mayor número de lesiones intraepiteliales de alto grado (especialmente CIN2+) y reducen drásticamente la incidencia de cáncer de cuello de útero, comparado con el cribado basado exclusivamente en citologías en mujeres de edad mayor o igual a 30 años; de hecho, es importante tener en cuenta la importancia de la identificación temprana y tratamiento de las lesiones CIN2+. La elevada sensibilidad de las técnicas es una constante en todos los métodos y especialmente en el sistema que nuestro grupo ha empleado (cobas® 4800, Roche). Otros estudios han evaluado el uso de diferentes técnicas de cribado del VPH como herramienta inicial, principalmente en lesiones de significado incierto y lesiones de bajo grado[21].

Los datos obtenidos en nuestro estudio permiten inferir varias conclusiones de alto interés en mujeres con lesiones sospechosas pre-tumorales en el cuello de útero. Una de ellas es la elevada cantidad de PCR positivas en citologías descritas como ASC-US, tanto en PCR positivas para VPH16 como para VPH Otros. La segunda objeción de interés es que 37 pacientes tuvieron citologías negativas y PCR positivas, 7 en PCR VPH16 y 31 en PCR VPH Otros.

Con respecto a las LSIL era de esperar VPH PCR positivas, pero lo más llamativo es que 30 pacientes LSIL presentaron PCR positivas para VPH Otros. Dicho de otra manera, sorprende la cantidad de virus de alto riesgo presentes en lesiones de cierta benignidad, independientemente del curso evolutivo que vayan a desarrollar. En los resultados que presentamos es interesante observar el número de PCR positivas VPH Otros, nada menos que 181.

Las frecuencias de edades son importantes si consideramos que el cribado co-test planteado en mayores de 30 años es necesario. Los datos obtenidos reflejan un predominio de PCR positivas VPH16 entre las edades 38-40 años o 42-44 años, en el caso

de PCR positivas VPH18 no es significativo y con respecto a PCR positivas VPH Otros 34-36 y 42-44 años.

Muñoz *et al.*[22] clasificaron los tipos oncogénicos y multitud de autores hablaron de la relevancia clínica de sus resultados. Otro estudio describe cómo varios grupos de mujeres infectadas por el VPH16 y VPH18 presentaban un riesgo de desarrollo de lesiones CIN2+ del 20 y 17%, respectivamente, frente al 1-2% infectadas por VPH Otros[23]. Nuestro grupo ha intentado aclarar el protagonismo que tienen las coinfecciones mixtas de VPH-AR en lesiones de cuello de útero de significado dudoso o de bajo riesgo oncológico y la implicación de otros virus de alto riesgo en lesiones pre-tumorales.

En la actualidad la importancia clínica de este tipo de infecciones es controvertida, aunque existen estudios interesantes donde se localizan infecciones mixtas en lesiones cervicales de alto grado (HSIL)[23,24]. En dicho contexto las infecciones mixtas o coinfecciones por VPH-AR o incluso con virus de bajo riesgo reflejan mayor tolerabilidad inmunológica en asociación múltiple con otras infecciones o simplemente reinfecciones. Este hecho nos puede ayudar a sospechar una persistencia de la infección y progresión de determinados tipos de lesiones.

La Asociación Americana de Colposcopia y Patología Cervical[25] deja claro las pautas de actuación en cada uno de los casos e interpreta los resultados virológicos con cautela. Nuestro grupo pretende reflejar datos de la presencia de VPH Otros (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) en lesiones pre-tumorales con cierta importancia, lo que nos lleva a ser cautelosos con respecto a los datos obtenidos.

Creemos que el papel de las coinfecciones o infecciones mixtas en patología tumoral de cérvix es una entidad clara que se ha de considerar y podemos afirmar su importancia en el diagnóstico del virus del papiloma humano de alto riesgo, así como el estudio del genotipado[26] en pacientes con alta sospecha tumoral, en centros oncológicos como el nuestro o simplemente en lesiones sospechosas de patología pre-tumoral en una franja de edad muy concreta y en una población a estudio muy específica.

Concluimos que el cribado del VPH de alto riesgo y su genotipado son fundamentales para el diagnóstico y tratamiento. Los métodos moleculares aprobados por la FDA y concretamente el cobas® 4800 System ofrecen excelentes garantías para los objetivos buscados (genotipado y cribado oportunista o no) y que, en función de los resultados obtenidos, consideramos que es necesario realizar técnicas de biología molecular previas o de forma colateral (co-test) a la observación de citologías y no a la inversa. Con respecto a la vacunación, según los datos obtenidos, sería interesante incluir más genotipos, principalmente por la cantidad de detecciones presentes en lesiones pre-neoplásicas.

Agradecimientos

Jonatan A. González Monsalve (doctorando en Matemática Computacional, Universidad Jaume I, Campus Rio-Sec, Departamento Matemáticas, Castellón de la Plana, España).

Enrique García García (Servicio de Ginecología, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España).

Carmen Illueca Ballester (Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España).

Eduardo Aznar Oroval (Servicio de Análisis Clínicos y Microbiología, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, España).

Bibliografía

1. Rodríguez-Iglesias M. Diagnóstico molecular de papilomavirus humano: nuevos desafíos en un escenario diferente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 2012 [Epub a print].
2. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 2006; 118: 3.030-3.044.
3. Torné Blade A, Del Pino Saladrigues M, Cusidó Gimferrer M, Alameda Quitllet F, Andia Ortiz D, Castellsagué Piqué X *et al.* Guía de cribado del cáncer de útero en España 2014. *Rev Esp Patol.*, 2014; 47: 1-43.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.*, 2013; 49: 1.374-1.3403.
5. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G *et al.* Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cáncer. *Vaccine*, 2012; 30: F88-99.
6. Von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16 (INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics*, 2012; 9: 149-163.
7. Castellsaqué Piqué X, Boscha José FX. Vacunas frente al virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 2008; 26 Supl 1: 65-77.
8. Meijer CJ *et al.* Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecology Oncology*, 2006; 103: 12- 17.
9. Bulk S, Berhof J, Bulkmans NW *et al.* Preferential risk of HPV 16 for squamous cell carcinoma and of HPV 18 for ademocarcinoma of the cervix compared to woman with normal cytology in the Neatherlands. *Br J Cancer*, 2006; 96: 171-175.

10. Castellsague X, Díaz M, de Sanjose S *et al*. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and it´s cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*., 2006; 98: 303-315.
11. Daling JR, Sherman KL, Hislop TG, Maden C, Mandelson MT, beckmann AM *et al*. Cigarrette smoking and the risk of anogenital cancer. *Am J Epidemiol*, 1992; 135: 180-189.
12. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Wright TC. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*., 1997; 337: 1.343-1.349.
13. Who Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. Invasive squamosus-cell cervical carcinoma and combined oral contraceptives: results from a multi-national study. *Int J Cancer*, 1993; 55: 228-236.
14. Muñoz N, Castellsagué X, De González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 2006; 24 Suppl. 3: 1-10.
15. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, van den Brule AJ, Ronderos M *et al*. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*., 2004; 190: 2.077-2.0787.
16. National Cancer Institute WorKshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA*, 1989; 262: 931-934.
17. Johnson R A. Wichern D W, Applied Multivariate Statistical Analysis, Ed. 4, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1999.
18. Montgomery D, Design and Analysis of Experiments, Ed 6, Wiley, Arizona State University, 2005.
19. Nobbenhuis MA *et al*. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus with abnormal cervical smear. *Lancet*, 2001; 358: 1.782-1.783.
20. Nobbenhuis MA *et al*. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet*, 1999; 354: 20-25
21. Ho L, Terry G, Londesborough P, Cuzick J, Lorenzato F, Singer A. Human papillomavirus DNA detection in the manegent of women with twice mildly abnormal cytological smears. *J Med Virol*. 2003: 69:118-121.
22. Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*., 2003; 348:518-527.
23. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Whacholder S, Sherman M, Scott DR *et al*. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papi-

llomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.*, 2005; 97: 1.072-1.079.

24. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto A, ter Schegget J *et al*. Developed and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*, 1999; 37: 2.508-2.517.
25. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J *et al*. American cancer society, American society for colposcopy and cervical pathology, and American society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*, 2012; 137: 516-542.
26. Chacón J, Sanz I, Rubio MD, de la Morena ML, Díaz E, Mateos ML *et al*. Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 2007; 25: 311-316.