

# SECCIÓN 2: RESUMEN DE LAS PRUEBAS DE VPH DISPONIBLES

## MENSAJES CLAVES

- La identificación de VPH puede lograrse por diferentes métodos: pruebas de detección del ADN de VPH y pruebas de detección de ARNm E6/E7.
- Las pruebas disponibles en el mercado en este momento y utilizadas en algunos países en sus programas de tamizaje de cáncer cervicouterino son: Hybrid Capture II (Qiagen), CareHPV (Qiagen), Cobas (Roche), Cervista (Hologic), Aptima (Hologic), BD HPV Assay (BD), y Xpert HPV (Cepheid).
- Para seleccionar la prueba de VPH, se deben considerar los resultados de ensayos clínicos, la validación clínica de la prueba y otros aspectos operacionales y de logística.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PRUEBAS DE VPH

Uno de los elementos críticos en los programas de tamizaje de cáncer es el conocimiento de las características técnicas y operativas de las pruebas disponibles. En la actualidad, se encuentran en el mercado cerca de cien pruebas comerciales para la detección de VPH y, a pesar que se trata de técnicas estandarizadas, aquellas que no son reproducibles, que no han sido validadas o que carecen de pruebas de fiabilidad y precisión, no se deben utilizar en la gestión clínica ni en programas poblacionales. Por lo tanto, es importante que las pruebas de VPH tengan la máxima sensibilidad clínica sin comprometer la especificidad.

En los programas de tamizaje de cáncer de cuello uterino, la detección de VPH puede realizarse mediante pruebas directas que permiten la identificación del genoma de VPH de alto riesgo (VPH-AR), de amplificación de un fragmento de ADN viral, con o sin genotipificación, o mediante la detección de ARNm (Ver tabla 1). Las primeras identifican de manera directa el ADN de algunos de los 13 tipos de VPH que son considerados carcinogénicos<sup>2</sup> sin realizar amplificación previa del ADN. Las segundas amplifican un fragmento del ADN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener millones de copias del mismo tanto de manera convencional como en tiempo real. Las pruebas de genotipificación permiten identificar los tipos

<sup>2</sup> En la actualidad, se han descrito más de 150 tipos de VPH de los cuales aproximadamente 50 causan infecciones en el epitelio genital. Los VPH que se consideran carcinogénicos son el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y el 68.

virales de manera específica (usualmente el VPH 16 y 18) y las de ARNm identifican la expresión de los genes de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.

**Tabla 1. Tipo de pruebas de VPH utilizadas para tamizaje**

PRUEBAS	TIPO DE TÉCNICA	NOMBRE
ADN	Directas-Detección del genoma	Hybrid Capture 2
		CareHPV test
	Amplificación	GP5+/GP6+ bio PCR-EIA
		Cervista HPV HR
		Cervista HPV 16/18
	Amplificación y genotipificación de VPH 16 y VPH-18	Cobas HPV test
		Xpert HPV
		Real Time High- Risk HPV
		PapilloCheck
ARN	Amplificación de proteínas E6/E7	Aptima HPV
		PreTect HPV-Proofer HV
	Anticuerpos monoclonales	AVantage HPV E6 Test

Uno de los criterios importantes para reconocer la utilidad de las pruebas en estos campos es su sensibilidad clínica. A continuación, se presenta una descripción de estas técnicas moleculares y de la evidencia científica en relación con su rendimiento en los programas de tamizaje para cáncer de cuello uterino.

## Pruebas directas

### **Captura de Híbridos 2**

La prueba de Captura de Híbridos 2 (CH2) es la prueba más antigua utilizada en tamizaje y ha sido validada clínicamente en múltiples estudios. Esta prueba permite la detección de VPH-AR por medio de la utilización de un cóctel de sondas para los 13 VPH-AR. Como su nombre indica, es una técnica en la cual se identifican híbridos ADN con sondas de ARN. La técnica de Captura de Híbridos 2 (Hybrid Capture 2, HC2) fue desarrollada originalmente por Digene Corporation (EE.UU.) y actualmente por Qiagen (EE.UU.) y desde el año 2000 cuenta con la aprobación de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para uso rutinario en las actividades de detección temprana en combinación con la citología. En América Latina, esta técnica ha sido aprobada en Colombia, Argentina y México.

La toma de la muestra puede ser realizada por médicos, enfermeras o auxiliares de enfermería, previamente capacitados, mediante un cepillo que se introduce en el canal endocervical. Este cepillo se coloca posteriormente en el tubo que acompaña la prueba de CH2, que contiene el medio para su transporte al laboratorio.

En el laboratorio, las células cervicales se someten a una solución alcalina desnaturalizante que expone el material genético. Posteriormente, mediante el uso de un cóctel de sondas de ARN (correspondientes a los 13 tipos de VPH-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), se produce, en presencia de cualquiera de estos virus, la formación de un híbrido ADN viral-ARN. La hibridación se identifica mediante anticuerpos específicos y una solución quimio-luminiscente que produce una emisión de luz cuando hay presencia de híbridos. Para el revelado de los híbridos, se requiere de un luminómetro.

La lectura final de la señal de quimio-luminiscencia permite reportar la prueba como positiva cuando hay emisión de luz o negativa cuando no la hay. Una prueba positiva significa que la mujer ha sido infectada por alguno de los 13 tipos de VPH-AR. Esta prueba no permite identificar cuál de ellos es y tampoco si la paciente tiene uno o varios de estos tipos. La prueba de CH2 no está diseñada para dar un resultado cuantitativo; algunos estudios han utilizado el valor de Unidad Relativa de Luz (RLU) como una evaluación cuantitativa de carga viral.

El procesamiento de las pruebas se puede realizar de manera manual, semiautomática o automatizarse mediante el uso de un robot. El juego de procesamiento semiautomático tiene una capacidad para 88 muestras, de manera que la entrega de resultados depende del tiempo necesario para completar el juego, que es usualmente de 15 días en promedio, de acuerdo con lo reportado en áreas de demostración en América Latina. Cuando se utiliza el método automatizado, el tiempo de entrega es de 5 horas aproximadamente para 352 muestras por corrida.

Entre las ventajas de esta prueba, se encuentran la alta sensibilidad y el alto valor predictivo negativo. Debido a esto, una paciente con una citología negativa y una determinación de VPH negativa tiene una probabilidad prácticamente nula de tener alguna lesión al menos durante los 5 años siguientes. Se han considerado desventajas, como su especificidad limitada (porque la mayoría de las infecciones no se asocian con lesiones) y que puede presentar reacciones cruzadas con sondas de bajo riesgo.

### **CareHPV**

Esta prueba tiene el mismo principio que la técnica CH2 producida por QIAGEN y detecta 14 tipos de VPH-AR en un formato automático y más rápido, que ha sido validado clínicamente. La toma de la muestra se hace de la misma forma que en la técnica CH2, descrita anteriormente. Se realiza la desnaturalización del ADN, su hibridación con una sonda de ARN, la captura y detección del híbrido, y la amplificación de la señal. CareHPV es una prueba rápida y accesible, fácil de entender, tolera variaciones de temperatura y no requiere refrigeración para su almacenamiento. Las limitaciones de esta técnica son similares a las de CH2. A diferencia de la prueba de CH2, CareHPV es una prueba rápida que requiere de 2.5 horas para procesar 90 muestras cervicales (1 montaje). Está disponible comercialmente en China e India y se está utilizando actualmente en varios proyectos de estudio de implementación en América Latina y otros países.

## **Pruebas de amplificación de ADN**

La amplificación de genes mediante PCR permite obtener millones de copias a partir de un fragmento de ADN particular. Se han diseñado diferentes conjuntos de *primers* o cebos, que en su mayoría han sido dirigidos

hacia la región L1 y que permiten diferenciar, mediante sondas específicas, los tipos más frecuentes de VPH de alto, intermedio y bajo riesgo efectuando una hibridación en placa de los productos biotinilados previamente amplificados por PCR. Esta técnica es muy sensible, con un nivel de detección hasta de una copia viral. Sin embargo, debido a su alta sensibilidad, este método es muy susceptible a contaminación. En la actualidad existen, además de las PCR genéricas, aquellas tipo-específicas que reportan algunos tipos virales y las PCR múltiples que identifican varios fragmentos del genoma. Entre las pruebas se encuentran, entre otras, GP5+/GP6+, Cervista, Cobas, Abbott y GeneXpert.

### **GP5+/GP6+ bio PCR-EIA**

Aunque esta técnica no es de uso para programas de tamizaje de cáncer cervicouterino, se utiliza en ensayos y ha sido validada a nivel clínico. Es una técnica desarrollada mediante el uso de los *primers*, o cebos, GP5+/GP6+bio que amplifican un fragmento de la región L1 del VPH. Esta técnica permite la detección de 37 tipos virales: 14 VPH-AR y 23 VPH de bajo riesgo (VPH-BR). Esta prueba tiene la ventaja de que los productos de PCR para los tipos de VPH de alto riesgo específicos se pueden genotipificar por medio de la técnica '*reverse line blot*'. Es una de las técnicas que más se ha utilizado a nivel mundial en estudios de investigación.

Los productos de PCR se hibridan a una mezcla de oligonucleótidos específicos. Para la detección, se utiliza un ensayo inmunoenzimático (EIA). La aplicación de la técnica GP5+ / 6+ PCR-EIA en extractos crudos tiene una sensibilidad analítica alta.

Entre sus ventajas, se encuentra que maneja un formato simple, hasta 42 productos de la PCR se pueden escribir simultáneamente por membrana por día, las membranas se pueden rehibridar fácilmente al menos 15 veces sin una pérdida de especificidad ni sensibilidad. Su limitación es que no se encuentra disponible comercialmente.

### **Cervista HPV HR y Cervista HPV 16/18**

Cervista HPV HR es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la detección cualitativa de 14 tipos de VPH-AR en muestras cervicouterinas que ha sido validada analítica y clínicamente. Cervista HPV HR no hace la identificación por tipo específico de VPH. Cervista HPV 16/18 permite la detección de VPH 16 y 18, fue aprobado por la FDA en 2009 para usarla en conjunto con la citología cervical en mujeres mayores de 30 años.

Cervista usa la química de Invader como método de amplificación de la señal de detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Este método usa dos tipos de reacciones isotérmicas que ocurren simultáneamente: una reacción primaria en la secuencia del ADN objetivo y una reacción secundaria, que produce una señal fluorescente. El equipo cuenta con un control interno que reduce los falsos negativos generados por el bajo número de células. La genotipificación de Cervista HPV 16/18 utiliza la misma tecnología de Cervista HPV. Una de las ventajas es que esta técnica es altamente reproducible y sensible. El control interno contenido en la prueba para verificar la calidad de la muestra es una de sus mayores ventajas en el mercado. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones según el fabricante, tales como: reactividad cruzada con dos tipos de VPH de riesgo desconocido; positivo para VPH-67 con 5.000 copias/reacción y positivo para VPH 70 con 50.000 copias/reacción. Además, con niveles bajos de infección o errores en la toma de muestra, esta técnica puede inducir a falsos negativos.

## **COBAS 4800**

El Cobas 4800 es una prueba cualitativa *in vitro* que detecta 14 tipos de VPH-AR y que ha sido validada clínicamente. Puede detectar 12 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y reporta específicamente los genotipos de alto riesgo 16 y 18. La técnica utiliza el gen de  $\beta$  globina como control interno para la integridad, extracción y amplificación de la muestra. Esta prueba fue aprobada por la FDA para tamizaje primario.

El equipo está totalmente automatizado, facilitando el flujo de trabajo del laboratorio; consta de un termociclador Cobas Z y el software necesario para la realización de la PCR en tiempo real, usando *primers*, o cebos, para la región L1 del VPH. El procedimiento incluye el procesamiento de muestras de extracción de ADN y el análisis por la tecnología de PCR en tiempo real. La técnica no presenta reactividad cruzada con genotipos no carcinogénicos. Además, es mínimo el contacto que el profesional tiene con la muestra, evitando así posibles contaminaciones. Este equipo puede realizar 96 pruebas en aproximadamente 5 horas.

Las ventajas de este equipo son: reducción del tiempo de procesamiento y de trabajo; reducción de los movimientos repetitivos; reducción del riesgo de los errores debidos a la fatiga; reducción de la producción de residuos de riesgo biológico; y reducción de los costos al eliminar la necesidad de reactivos adicionales.

Entre las limitaciones indicadas por el fabricante se encuentra que la prueba debe realizarla personal con experiencia en el empleo de técnicas de PCR y en la utilización del sistema Cobas 4800. Además, solamente el equipo Cobas x 480 y el analizador Cobas z 480 se han validado para su uso con este producto. No debería utilizarse ningún otro equipo de preparación de muestras ni sistema de PCR con este producto. La presencia de inhibidores de la PCR puede dar lugar a resultados de falsos negativos o resultados no válidos, al igual que el bajo número de copias del virus en la muestra.

## **Abbott RealTime**

La prueba de VPH-AR Abbott RealTime permite detectar 14 genotipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). Esta prueba reporta, de manera separada a los otros 2 genotipos de alto riesgo, los genotipos 16 y 18.

Este es un proceso cualitativo *in vitro* completamente automatizado que se encuentra validado clínicamente de acuerdo a los requerimientos internacionales para su uso en el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años.

El equipo está compuesto por una unidad m2000sp que se encarga de preparar el ácido nucleico y un analizador m2000rt que realiza la PCR en tiempo real. Se utiliza una mezcla de múltiples *primers*, o cebos, y sondas para la amplificación y detección de ADN del VPH-AR. Como control de calidad interno de las células cervicales, recogidas en citología en medio líquido, se utiliza el gen de  $\beta$  globina. El tiempo de respuesta del proceso es de 6 a 8 horas para 96 muestras y depende del método utilizado para la extracción de ADN.

Las ventajas de esta técnica son la automatización de los múltiples pasos, reduciendo así el personal; el tiempo empleado; y el riesgo de contaminación. Una de las limitaciones de la prueba es la interpretación subjetiva. La técnica de PCR en tiempo real se ha introducido en los últimos años en el diagnóstico molecular

del VPH como herramienta para la determinación cuantitativa de la carga viral así como para el diagnóstico de la infección. La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de doble cadena como el SYBR Green o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas, tales como las sondas Taqman, cebadores fluorescentes o Molecular Beacons y sondas de hidrólisis. La utilización de sondas aumenta la especificidad de la reacción.

### ***Becton Dickinson (BD)***

La prueba de VPH BD es una PCR en tiempo real que amplifica la región que codifica las oncoproteínas E6/ E7 de los tipos de VPH-AR y tiene validación clínica. Estas regiones están presentes durante todas las etapas de la progresión de la enfermedad y el ensayo se ha diseñado para permitir la detección de regiones específicas, según el tipo del virus, en lugar de la amplificación de las regiones genómicas detectadas con conjuntos de cebos de L1. El ensayo proporciona información individual para 6 tipos de VPH (16, 18, 31, 45, 51, y 52), al igual que la detección de todos los 14 VPH-AR. El rendimiento del ensayo BD es equivalente a otros ensayos aprobados por FDA y la comisión europea CE (Conformité Européene), incluyendo CH2, y utilizando especímenes cervicales recolectados en el medio PreservCyt (Hologic, Marlborough, MA).

Las muestras se procesan en la plataforma llamada el BD Viper, que cuenta con un control de calidad interno. Esta técnica obtuvo la aprobación de la CE en enero y está disponible para su uso comercial en Europa. La plataforma está totalmente automatizada y se pueden procesar 1-30 muestras, permitiendo 120 resultados de pacientes por día e incluyendo la genotipificación.

### ***Xpert HPV (Cepheid)***

La prueba Xpert HPV es una PCR en tiempo real que detecta simultáneamente el ADN codificante para las oncoproteínas E6/E7 de 13 tipos de VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68) más el VPH 66. Las muestras se procesan con cartuchos individuales en la plataforma de análisis clínico, GeneXpert de Cepheid (Sunnyvale, California). La plataforma tiene una capacidad para procesar desde 1 muestra hasta 80 muestras, en una hora. Los resultados se reportan para todo los tipos de VPH de alto riesgo, así como la presencia de genotipos de VPH de alto riesgo.

## **Detección de ARNm E6/E7**

El proceso carcinogénico es regulado por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH y, por lo tanto, la expresión excesiva de estos genes es un marcador de riesgo para cáncer de cuello uterino. Se ha postulado que la detección de la expresión de oncogenes E6/E7 podría ser más específica y predecir mejor el riesgo de cáncer que la prueba ADN-VPH. Existen al menos dos métodos que usan la detección del ARN, la prueba APTIMA de ARNm E6/ E7 (Gen-Probe), que detecta 13 tipos de VPH-AR y el VPH 66, y la prueba PreTect HPV-Proofer (NorChip), que detecta el ARN de los tipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 45.

### ***APTIMA HPV Assay***

Es una prueba cualitativa que se basa en la detección directa de la expresión de ARNm de las oncoproteínas E6 y E7, procedente de los 14 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) mediante una

amplificación en tiempo real. La prueba de APTIMA HPV no discrimina entre los 14 tipos; para esto, se pueden analizar muestras de cuello uterino recogidas en viales para citología ThinPrep con solución PreservCyt. El ensayo incorpora un control interno para supervisar la captura, la amplificación y la detección del ácido nucleico, así como los errores del usuario o del instrumento APTIMA HPV E6/E7. Esta técnica puede realizar hasta 250 pruebas en aproximadamente 5 horas.

Esta técnica fue aprobada por la FDA en 2011 para el tamizaje en mujeres a partir de los 30 años, en combinación con la citología.

Esta ensayo presenta algunas limitaciones, entre ellas, que no ha sido evaluado en personas vacunadas del VPH; que la detección de ARNm de HPV de alto-riesgo depende del número de copias presentes en el espécimen y que, además, según la literatura, se pueden presentar falsos positivos con VPH de bajo riesgo.

## Arbor Vita

La prueba OncoE6 es una prueba de tira de flujo lateral que detecta niveles elevados de E6 viral oncogénica como marcador biológico y podría ser utilizada como una prueba de la clasificación de mujeres positivas a la prueba de VPH (triaje). El producto ha sido evaluado en un estudio a gran escala en China. La prueba tiene la aprobación de la CE y está lista para su comercialización.

La recolección de la muestra se realiza utilizando un hisopo de Dacron y medios PreservCyt. No requiere de equipo complejo para el procesamiento. Los costos de equipo son alrededor de US \$2.000 y permite ejecutar más de 45 especímenes por operador al día, pudiendo ser procesado en una clínica dentro de unas 2-2.5 horas, por lo que es fácil para una pantalla.

## Evidencias científicas respecto a las pruebas de tamizaje

Las evidencias científicas para demostrar que aquellas pruebas que permiten la identificación del VPH son eficaces para la reducción de la mortalidad por cáncer de cuello uterino se obtienen de estudios de corte transversal en los que se evalúan de manera concomitante las pruebas con la citología de cuello uterino para evaluar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas. La evidencia se obtiene realizando ensayos clínicos aleatorizados en los cuales las mujeres se asignan a dos grupos: uno de ellos, intervención con prueba de VPH y el otro, control con citología. Esto permite evaluar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas así como, en algunos estudios, la reducción de la incidencia y mortalidad por cáncer.

En la tabla 2 se presenta la sensibilidad para NIC3 así como la especificidad de las pruebas descritas anteriormente.

**Tabla 2. Rendimiento de las pruebas de VPH utilizadas para tamizaje primario**

PRUEBA	SENSIBILIDAD NIC3	ESPECIFICIDAD
Captura de Híbridos 2	97,5	84,3
CareHPV	90,0	84,2
Cervista HPV 16/18	100	
Cobas 4800 HPV	97,3	84,5
RealTime	95,0	87,2
Aptima HPV	97,6	90,2
Xpert HPV	100	81,5

Fuente: Cuzick J et al. 2013.

## Selección de la prueba de VPH para el programa de tamizaje

Una vez que se ha tomado la decisión política de introducir la prueba de VPH, se debe elegir una prueba entre la amplia variedad disponible en el mercado. Para esta selección, se deben considerar la validación clínica de la prueba, aspectos operacionales y logísticos, además de los costos y beneficios de la prueba. Algunas consideraciones son:

- ¿Qué tipos de VPH se detectan con la prueba?
- ¿Cómo se presentan los resultados: positivo- negativo o por tipo de VPH?
- ¿Cuáles son los requerimientos y costos de los insumos y equipo?
- ¿Cuál es el tamaño adecuado del lote para procesar las muestras?
- ¿Cuánto tiempo toma el procesamiento de la muestra?
- ¿Qué tipo de capacitación se requiere para procesar la prueba?
- ¿Qué apoyo está disponible en el país para la instalación y el mantenimiento del equipo?
- ¿Cómo se controla la calidad de los resultados de la prueba?
- ¿Se puede utilizar la prueba de VPH en forma de autotoma?
- ¿Cuáles son los requisitos para el almacenamiento, caducidad y otros aspectos de la gestión de la cadena de abastecimiento?
- ¿Cuáles son las condiciones o arreglos con los distribuidores locales para la provisión de la prueba, incluyendo el precio?
- ¿Qué aspectos o insumos están incluidos en el precio (reactivos, equipos, pipetas, etc.)?

### ***Consideraciones para la selección de la prueba de VPH***

- Antes de seleccionar una prueba de VPH entre la amplia variedad disponible en el mercado, se debe realizar un análisis de costo-beneficio y considerar la factibilidad de implementar la prueba en el contexto del programa de tamizaje.
- Se deben elegir solo las pruebas de VPH que tienen una validación clínica.
- Las pruebas autorizadas por agencias reguladoras, tal como la FDA, serían opciones seguras.
- Introducir una prueba en un programa y luego cambiarla por otra será difícil y tendrá implicaciones de costos.
- Las pruebas tienen fecha límite, por ejemplo 9 meses o 12 meses, y hay que tomar en cuenta los aspectos de la gestión de la cadena de abastecimiento al elegir la prueba y su aplicación en el programa.