

Infección por virus del papiloma humano en mujeres con citología negativas en un ensayo de familiarización con la prueba Cobas® 4800 VPH

Human papillomavirus infection in negative cytology women in a familiarization trial with the Cobas® 4800 HPV test

Nadezhda González García^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2380-7953>

Alexander Ortega Carballosa¹ <https://orcid.org/0000-0002-2973-058X>

Milania Díaz López¹ <https://orcid.org/0000-0001-5910-8495>

Biler Salcedo González¹ <https://orcid.org/0000-0002-3829-8418>

Gissel García Menéndez¹ <https://orcid.org/0000-0002-9851-2041>

¹Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: nadezhdagonzalez@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Los genotipos oncogénicos del virus del papiloma humano se han asociado al desarrollo del cáncer cervicouterino. Las estrategias de prevención y detección temprana avanzan hacia la integración del conocimiento molecular y los perfiles de estratificación de riesgo para representar de manera más precisa a la persona en riesgo, conocida actualmente como medicina de precisión.

Objetivo: Detectar el virus del papiloma humano y los genotipos oncogénicos individuales en un estudio de familiarización de un método de biología molecular.

Métodos: Se realizó un estudio para detectar el virus del papiloma humano con la prueba Cobas® 4800 VPH durante la familiarización para la introducción del método en el Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. Se realizaron 929 determinaciones en mujeres asintomáticas entre 30 y 50 años, con citología negativa en los 12 meses anteriores a la inclusión. Las muestras de ADN se obtuvieron de células cervicales recolectadas en el medio Cobas®.

Resultados: El virus del papiloma humano se detectó en 17,7 % de las muestras. De ellas, el 13,3 % tenían el genotipo 16, el 10,7 % el genotipo 18 y el 76 %; fueron positivas para los otros genotipos de alto riesgo.

Conclusiones: Con el método se detectó una elevada frecuencia de infecciones por virus del papiloma humano en las mujeres, con proporciones mayores del genotipo 16 y 18 y de otros de alto riesgo que se asocian a la evolución hacia el cáncer cervicouterino.

Palabras clave: virus del papiloma humano; prueba Cobas HPV; pesquisaje cáncer cérvico-uterino.

ABSTRACT

Introduction: Oncogenic genotypes of human papillomavirus have been associated with the development of cervical cancer. Prevention and early detection strategies are moving towards the integration of molecular knowledge and risk stratification profiles in order to represent, more accurately, the individual at risk, which is currently known as precision medicine.

Objective: To detect human papillomavirus and individual oncogenic genotypes in a familiarization trial based on a molecular biology method.

Methods: A study was carried out to detect human papillomavirus using the Cobas® 4800 human papillomavirus test during familiarization for the introduction of the method at Hermanos Ameijeiras Clinical Surgical Hospital. A total of 929 women, aged 30-50 years, were determined to be asymptomatic, with negative cytology in the twelve months prior to inclusion. DNA samples were obtained from cervical cells collected in Cobas® medium (Cobas® PCR CellCollection Media, PreservCyt® Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Results: Human papillomavirus was detected in 17.7% of the samples. Of these, 13.3% had the genotype 16; 10.7%, the genotype 18; and 76% were positive for the other high-risk genotypes.

Conclusions: The method detected a high frequency of human papillomavirus infections in women, with higher proportions of genotypes 16, 18 and other high-risk genotypes associated with progression to cervical cancer.

Keywords: human papillomavirus; Cobas human papillomavirus test; cervical cancer screening.

Recibido: 17/09/2021

Aprobado: 16/11/2021

Introducción

Los genotipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH) se han asociado al desarrollo del cáncer cervicouterino.⁽¹⁾ Las estrategias de prevención y detección temprana avanzan hacia la integración del conocimiento molecular y los perfiles de estratificación de riesgo para representar de manera más precisa a la persona en riesgo, conocida actualmente como medicina de precisión.⁽²⁾ Se describen cerca de 120 genotipos de VPH, que, de acuerdo a su potencialidad para inducir carcinogénesis, se clasifican en genotipos de alto (VPH-AR) y de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR). En del grupo de VPH-AR se incluyen entre 15 y 19 genotipos que se relacionan, en mayor o menor proporción, con la etiología del cáncer cervicouterino (CaCU).⁽³⁾ Se establece que prácticamente todos los casos de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras inmediatas, surgen de infecciones cervicales persistentes ocasionadas por aproximadamente 15 genotipos de VPH-AR.⁽⁴⁾ Los más frecuentes son el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58. En particular, los genotipos 16 y 18 causan cerca del 70 % de los casos de CaCU.⁽⁵⁾

En Cuba, el cáncer cervicouterino constituye una de las primeras causas de muerte por cáncer en la mujer. A pesar de que estas tasas de mortalidad están entre las más bajas de América Latina, en los últimos años se ha evidenciado un ligero incremento en este indicador. Tal comportamiento muestra la necesidad de un perfeccionamiento en el sistema de pesquisa, lo cual puede lograrse incluyendo la detección molecular de la infección por VPH.⁽⁵⁾

La detección temprana ofrece la oportunidad de tratar las lesiones premalignas y evitar la progresión al cáncer cérvicouterino. En este sentido, la biología molecular ha sido clave para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad mediante diferentes técnicas moleculares para detectar y tipificar este oncovirus.⁽⁵⁾

Los métodos de biología molecular basados en la detección del genoma del ácido desoxiribonucleico (ADN) del VPH son la principal vía para su diagnóstico.⁽⁵⁾ La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o en tiempo real (PCR-TR) facilita, además de la detección, la cuantificación del ADN viral con ventajas como la rapidez, la amplia variedad de plataformas de amplificación y el mínimo riesgo de contaminación.⁽⁵⁾ Estos métodos constituyen ensayos eficientes para poder definir programas de pesquisa para la detección precoz del cáncer cérvicouterino y para evaluar la eficacia del empleo de las vacunas que se encuentran disponibles en el mercado internacional.⁽⁶⁾

Como parte de este programa en Cuba⁽⁷⁾ se realiza la citología cervical cada tres años a todas las mujeres mayores de 25 años dentro de la atención primaria de salud, pero no se incluyen las técnicas moleculares para la detección de VPH en ninguna de las etapas del programa, aunque la detección viral es actualmente una herramienta de gran utilidad para el detectar las lesiones precursoras del cáncer cervical.

En el mundo existen varias pruebas para el pesquiasaje del cáncer cervicouterino. La detección de VPH se realiza mediante pruebas directas que permiten identificar el genoma de VPH de alto riesgo (VPH-AR), amplificar un fragmento de ADN viral, con o sin genotipificación, o detectar el ácido ribonucleico mensajero (ARNm).⁽⁵⁾ En Cuba se han utilizado técnicas de biología molecular para realizar estudios de prevalencia de infección en mujeres con citologías positivas y negativas pero mediante métodos que, o identifican pocos genotipos oncogénicos, o no lo hacen de manera individual sin reactividad cruzada con otros no oncogénicos.⁽⁵⁾

La prueba Cobas® 4800 VPH (Roche) es una prueba cualitativa *in vitro* que brinda simultáneamente resultados individuales de los genotipos de mayor riesgo (VPH 16 y VPH 18) y resultados agrupados de 12 genotipos de VPH de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) en un solo análisis a través de la amplificación del ADN por la PCR. Esta técnica utiliza el gen de la beta globina como control interno para la integridad, extracción y amplificación de la muestra.⁽⁵⁾

Los avances en la prevención y la detección precoz del cáncer cervicouterino en el mundo con el pesquiasaje del VPH en las citologías permiten adaptar las técnicas comunes en la medicina de precisión a las iniciativas de prevención del cáncer en Cuba. Por ello se introdujo la prueba Cobas® 4800 HPV (Roche) para el diagnóstico del VPH en el Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijerías” y es un avance en el empleo de estas técnicas moleculares. Este sistema está validado por la Agencia de los Estados Unidos de América para la Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration, FDA*) desde el 2011 para el pesquiasaje primario del cáncer cervicouterino en mujeres mayores de 25 años. Clínicamente esta validado por el estudio de referencia (*Addressing The Need for Advanced Diagnostics, ATHENA*).⁽⁸⁾

Teniendo en cuenta las ventajas del método Cobas® 4800 VPH el objetivo fue detectar el virus del papiloma humano y los genotipos oncogénicos en un estudio de familiarización.

Métodos

Diseño general del estudio y selección de la muestra

El presente estudio formó parte de una familiarización de tecnologías realizada en el Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijerías” en colaboración con el Hospital Ginecobstétrico “Ramón González Coro” para estratificar el riesgo de las mujeres de padecer cáncer cervical utilizando la prueba Cobas® 4800 VPH (Roche).

Se estudiaron 929 muestras de exudado pertenecientes a mujeres entre 30 y 40 años con citología negativa en los 12 meses anteriores a la inclusión y que dieron su consentimiento escrito a participar en el estudio.

Fueron considerados como criterios de exclusión:

- Haber recibido tratamiento quirúrgico, ablativo, radiante o quimioterapia hasta 3 meses previos a la inclusión.
- Estar en estado de gestación o durante la lactancia materna.
- Con infecciones locales moderadas o graves que interfieran con la evaluación.
- Con enfermedades que comprometen el estado de conciencia del paciente o su posibilidad de colaborar en el ensayo.

Colección y procesamiento de las muestras para obtención del ADN viral

Las células endocervicales se recolectaron con un cepillo citológico. Una vez tomada la muestra, se hizo girar el cepillo suavemente tres a cuatro veces dentro del vial que contiene el medio para la recolección de células Cobas PCR (*Cobas® PCR Cell Collection Media, PreservCyt®, Roche Diagnostics*), el cual permite la conservación de las células almacenadas a temperatura ambiente hasta 6 meses después de la fecha de recolección. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en el medio de preservación por un periodo de 4 a 6 meses hasta su procesamiento.

La extracción y purificación del ADN viral se realizó empleando el instrumento Cobas x 480 y para detectar la presencia del VPH se utilizó el estuche Cobas 4800 HPV Test (Roche Diagnostics). Este es un ensayo cualitativo de PCR en tiempo real totalmente automatizado que permitió la detección individual de los VPH-16 y VPH-18 y de un panel de otros 12 genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).⁽⁸⁾

Se utilizó el equipo de PCR en tiempo real Cobas z480 (Roche) para la amplificación de una secuencia de 200 pares de bases de la región L1 del genoma del VPH y del gen de la β -globina humana mediante la amplificación de una secuencia de 330 pares de bases usada como control interno para validación del proceso. Se utilizaron sondas TaqMan® marcadas con cuatro diferentes fluoróforos para la detección de los productos amplificados de la PCR. Los resultados fueron interpretados por el Cobas® 4800 System con el programa PA Cobas® HPV versión 2.0.

Para el análisis de los resultados se emplearon estadísticas descriptivas de frecuencias y porcentajes mediante el programa SPSS Versión 20.

Consideraciones éticas

El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de los dos hospitales. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de las personas, luego de explicar los posibles riesgos y beneficios de la investigación. La información se conservó bajo los principios de confidencialidad y sin revelar la identidad de las personas siguiendo las indicaciones de la Declaración de Helsinki para las investigaciones con seres humanos.⁽⁹⁾

Resultados

En la familiarización con la tecnología Cobas® 4800 VPH, todas las pruebas y los controles negativos y positivos fueron válidos.

El 16,1 % de las muestras (150/929) resultaron positivas para el VPH. De ellas, el 13,3 % (20/150) lo fueron al genotipo 16, el 10,7 % (16/150) al genotipo 18 y el 76 % (114/150) fueron positivas para los otros genotipos de alto riesgo (Fig.).

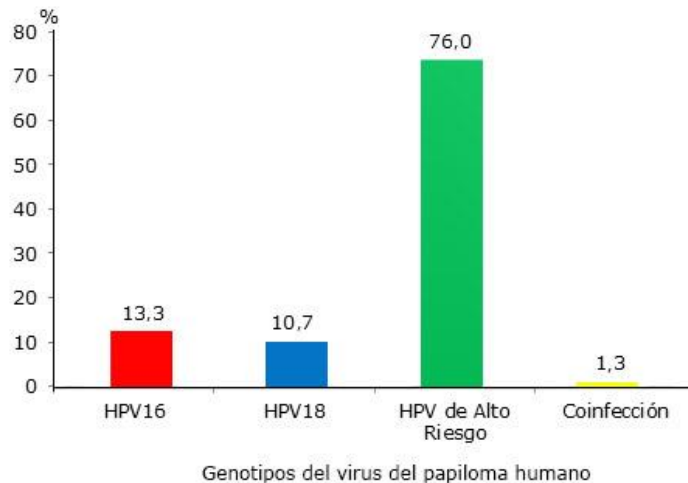


Fig. - Porcentaje de infección por genotipos del virus del papiloma humano.

En 1,3 % de las muestras positivas analizadas (3/150) se detectaron múltiples genotipos de HPV. En 2 de ellas, positivas para el genotipo VPH-16, fueron además detectados los genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y una muestra positiva para el genotipo VPH-18 mostró también reconocimiento para el panel de alto riesgo. No fueron detectadas coinfecciones entre los genotipos VPH 16 y VPH 18 (Fig.).

Discusión

Este constituye el primer estudio de familiarización realizado en Cuba con la prueba Cobas HPV, la cual permite detectar 14 genotipos diferentes del virus.

Nuestros resultados mostraron que la infección por genotipos de alto riesgo de HPV en mujeres cubanas se comportó de manera similar a la reportada en un estudio de pesquisaje con la tecnología Cobas 4800 HPV en el sur de China a 5650 mujeres asintomáticas. En este estudio, la prevalencia de los 14 genotipos fue de un 12,96 % y fue mayor la prevalencia para el panel de los 12 genotipos de alto riesgo y un menor porcentaje para los genotipos individuales 16 y 18.⁽¹⁰⁾

La detección del VPH a través de la prueba Cobas® HPV permite identificar la infección de alto riesgo y de mayor grado de extensión en mujeres que escapan a la prueba de Papanicolau, la cual es empleada en el pesquisaje de rutina. La implementación de esta tecnología hace más eficiente la vigilancia de la población femenina en edad fértil susceptible a la infección por VPH. Por otra

parte, un resultado negativo de la prueba Cobas® HPV es más confiable en términos diagnósticos que la citología, ya que brinda mayor seguridad para lesiones malignas en un período de tres años.⁽⁵⁾

En Cuba se han realizado algunos estudios para detectar los genotipos circulantes de VPH en la población cubana empleando otras tecnologías como la PCR en Tiempo Real, que detecta 6 genotipos de alto riesgo de mayor relevancia clínica y la técnica de microarreglos de baja densidad.⁽⁵⁾ En uno de estos estudios realizado en mujeres con citología negativa se reportaron proporciones mayores de los genotipos 16 y 18,⁽⁵⁾ resultado que no coincide con lo encontrado en la presente investigación, donde predominó el panel de los 12 genotipos de alto riesgo.

Tres aspectos pudieran explicar la divergencia con nuestros resultados. En ese estudio se empleó una tecnología de PCR en Tiempo Real que sólo detecta 6 genotipos, el número de muestras fue superior en nuestro estudio (929 vs. 111) y esa investigación se realizó en 2014, mientras que nuestra investigación tuvo lugar cuatro años después, por lo que la circulación de los genotipos virales podría haber cambiado.⁽⁵⁾

En relación a esta última posible causa, un reporte más reciente realizado en 2018 en nuestro país, evidenció la presencia de genotipos de alto riesgo en 14,8 % de las mujeres, destacándose la presencia del genotipo VPH-16, lo cual coincide con nuestros resultados, a pesar de haber empleado una tecnología diferente. Ambos resultados sugieren la necesidad de identificar estos genotipos de alto riesgo por la importancia que revisten tanto en el diseño de nuevos sistemas diagnósticos como para el diseño de posibles candidatos vacunales para nuestro país.⁽⁵⁾

El sistema Cobas 4800 HPV es un sistema automatizado por lo que es un método ideal y seguro para estudiar un gran número de muestras y facilita el flujo de trabajo del laboratorio. Emplea frascos con medio de recolección de células, por lo que garantiza la identificación correcta de los genotipos, así como elimina las posibilidades de detectar reactividad cruzada con genotipos no carcinogénicos.⁽⁸⁾ Estas características han hecho que sea uno de los sistemas recomendados para aplicar en el pesquisaje del cáncer cervicouterino.⁽¹¹⁾

Con este estudio piloto se demuestra la elevada frecuencia de la infección por genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en mujeres cubanas, aun cuando la citología es normal. Esta familiarización con el método muestra que es factible y útil introducir la prueba Cobas® 4800 VPH en el programa nacional en Cuba de pesquisaje de las lesiones intraepiteliales cervicales y trazar estrategias para la introducción de la vacunación contra el VPH.

Referencias bibliográficas

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers: a brief historical account. *Virology*. 2009[acceso: 28/06/2021];384(2):260-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135222>
2. Seiwert T. Accurate HPV testing: a requirement for precision medicine for head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2013[acceso: 28/06/2021];24(11):2711-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170608>
3. Mateos Lindemann ML, Perez Castro S, Rodríguez Iglesias M, Pérez Gracia MT. Microbiological diagnosis of human papilloma virus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017[acceso: 28/06/2021];35(9):593-602. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170608>
4. Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers WJ, Daalmeijer NF, *et al*. Clinical validation of the Cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol*. 2011[acceso: 28/06/2021];49(11):3983-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880968>
5. Guilarte García E, Soto Brito Y, Kouri Cardella V, Limia León CM, Sánchez Álvarez ML, Rodríguez Díaz AE, *et al*. Circulation of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in Cuban women. *MEDICC Rev*. 2020[acceso: 28/06/2021];22(1):17-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32327618>
6. Soto Y, Torres G, Kouri V, Limia CM, Goicolea A, Capo V, *et al*. Molecular epidemiology of human papillomavirus infections in cervical samples from Cuban women older than 30 years 2014 [acceso: 28/06/2021];210-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24270200>
7. Cabezas ET, Camacho A, Santana IB, Aguilar F, Romero T, *et al*. Programa diagnóstico precoz del cáncer de cuello del útero en Cuba. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública de Cuba; 1999[acceso: 28/06/2021]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/gin/vol37_2_11/gin11211.htm.
8. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Americ J Obstetric Gynecol*. 2012;206(1):46.e1-.e11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.024>.
9. Asociación Mundial de Medicina. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013.

AMM. 2013[acceso: 28/06/2021]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

10. Wang S, He X, Meng F, Pan Q, Zhang L, Zeng J. Application of the Cobas 4800 System for the detection of High-Risk human papillomavirus in 5650 asymptomatic women. NCBI. 2020[acceso: 28/06/2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32280677>

11. Du H, Duan X, Liu Y, Shi B, Zhang W, Wang C, *et al.* Evaluation of Cobas HPV and SeqHPV assays in the Chinese multicenter screening trial. J Low Genit Tract Dis. 2021[acceso: 28/06/2021];25(1):22-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33347045>

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.