



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Utilidad de la determinación VPH, genotipado y tinción dual p16/Ki67 en la prevención secundaria del cáncer de cuello de útero

Adriano Rodríguez Trujillo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis doctoral presentada por

ADRIANO RODRÍGUEZ TRUJILLO

con el título

**Utilidad de la determinación VPH, genotipado y
tinción dual p16/Ki67 en la prevención secundaria del
cáncer de cuello de útero**

para la obtención del título de Doctorado en

MEDICINA

Directores:

Marta del Pino Saladrígues

Aureli Torné Bladé

Barcelona, 17 de julio de 2018

**Facultat de Medicina
Departament de Medicina**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Agradecimientos

A la Dra. Marta del Pino, directora de esta tesis y gran profesional, no sólo porque sin ella esta tesis no hubiera sido posible, sino también por enseñarme el valor del trabajo bien hecho y, sobre todo, por creer y confiar en mi, apoyarme y darme buenos consejos para conseguir mis objetivos a nivel profesional.

Al Dr. Aureli Torné, también director de esta tesis y gran profesional, por haber invertido mucho tiempo para que esto saliera adelante, además de haber sido para mi un espejo de lo que tiene que ser un gran profesional. También por haberme escuchado y aconsejado en mi todavía corta carrera profesional cuando lo he necesitado.

Al Dr. Jaume Ordi, que no es oficialmente director de esta tesis pero para mí sí que lo es. Gracias por haberme ayudado casi de forma desinteresada con esta tesis doctoral y haberme hecho ver lo importante que es el equipo y que tenemos que trabajar para el.

A Esther y a Lorena, por todo el tiempo y paciencia que han tenido conmigo para enseñarme a trabajar en el laboratorio y de hacerlo siempre con buena actitud y ganas de enseñar. Sin ellas, lo más básico de esta tesis, que fue el trabajo de laboratorio, no hubiera sido posible.

A todos mis compañeros del equipo de investigación de VPH del Hospital Clínic, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado y hacerme sentir de pleno parte del equipo en todo momento.

Por supuesto a Elsa, que en lo que se refiere a esta tesis, siempre me ha apoyado sabiendo como nadie la importancia que tiene esta etapa para mi e ilusionarme incluso en los momentos en los que las cosas no han ido tan bien.

Y también a mis padres y hermanos, que sin entender muy bien a lo que me dedicaba ni mi situación profesional, me han apoyado siempre de forma incondicional.

Y por último, y no menos importante, a las pacientes objetos de este estudio, que son a las que realmente les debo esta tesis y nos estimulan a investigar y avanzar en el conocimiento.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer de cuello de útero
2. Lesiones precursoras e historia natural del cáncer de cuello de útero
 - 2.1 Definición y clasificación de las lesiones escamosas intraepiteliales
 - 2.2 Riesgo de progresión a cáncer de cuello de útero
3. El virus del papiloma humano
 - 3.1 Estructura y genoma viral
 - 3.2 Genotipos virales
 - 3.3 Mecanismo de carcinogénesis
 - 3.4 Epidemiología de la infección por el Virus del Papiloma Humano
 - 3.5 Papel del Virus del Papiloma Humano en el cáncer de cuello de útero y sus lesiones precursoras
4. El cribado del cáncer de cuello de útero y diagnóstico de sus lesiones precursoras
 - 4.1 Métodos de detección del Virus del Papiloma Humano
 - 4.1.1 Métodos morfológicos
 - 4.1.2 Métodos de detección de proteínas virales
 - 4.1.3 Métodos de biología molecular
 - 4.1.3.1 Hibridación *in situ*
 - 4.1.3.2 Captura de híbridos
 - 4.1.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - 4.1.3.4 Detección de ARN vírico

- 4.2 La citología cervical
 - 4.2.1 Citología convencional
 - 4.2.2 Citología en medio líquido
- 4.3 La colposcopia
- 4.4 Estudio histológico
- 5. Marcadores moleculares de infección viral con valor diagnóstico y pronóstico
 - 5.1 Genotipado VPH 16/18
 - 5.2 Sobreexpresión de ARNm de E6/E7
 - 5.3 p16/Ki67. Tinción dual
 - 5.4 ARNm de genes epiteliales asociados a la regulación del ciclo celular
 - 5.4.1 Topoisomerasa 2 alfa (TOP2A)
 - 5.4.2 Survivina (BIRC5)
 - 5.4.3 Metaloproteinasa 9 (MMP9)
 - 5.4.4 Proteína 5 del mantenimiento de los microsomas (MCM5)
 - 5.5 Hipermetilación de promotores genómicos
- 6. Manejo de las lesiones precursoras del cáncer de cuello de útero
 - 6.1 Manejo de las lesiones de bajo grado (LSIL/CIN1)
 - 6.1.1 LSIL/CIN1 precedido de citología de bajo grado
 - 6.1.2 LSIL/CIN1 precedido de citología de alto grado
 - 6.1.3 LSIL/CIN1 endocervical
 - 6.2 Manejo de las lesiones de alto grado
 - 6.2.1 HSIL/CIN2-3 y lesión pequeña sin afectación endocervical

6.2.2 HSIL/CIN2 en mujeres menores de 30 años

6.2.3 HSIL/CIN2-3 en gestantes

6.3 Manejo de adenocarcinoma *in situ* (AIS)

7. Vacunas frente al VPH

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

III. OBJETIVOS

IV. INVESTIGACIONES REALIZADAS. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

1. **Estudio 1.** Comparison of the Analytical and Clinical Performance of Five Tests for the Detection of Human Papillomavirus Genital Infection

2. **Estudio 2.** Value of HPV16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining to predict progression to HSIL/CIN2+ in negative cytologies from a colposcopy referral population

V. DISCUSIÓN GENERAL

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

I. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer de cuello de útero

El cáncer de cuello de útero (CCU) es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, por detrás del de mama, colon-recto y pulmón. Es el responsable de alrededor de 265.000 muertes anuales, lo que representa un 7,5% de todas las muertes por cáncer en mujeres,. Su incidencia estimada es de 528.000 nuevos casos al año en todo el mundo, con un claro desequilibrio entre regiones, ya que aproximadamente el 85% de los casos se da en los países menos desarrollados, donde suponen el segundo cáncer más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres (*Figura 1*). En Europa cada año se diagnostican unos 60.000 nuevos casos, siendo el cuarto cáncer más frecuente y la séptima causa de muerte por cáncer. Esta diferencia de incidencia y mortalidad entre países desarrollados y en vías de desarrollo se debe a la detección a través de citología y tratamiento de lesiones precursoras en los países en los que se han establecido programas de cribado poblacional¹.

Los CCU pueden clasificarse en función de su estirpe celular en tumores epiteliales, tumores mesenquimales, tumores mixtos epiteliales-mesenquimales, tumores melanocíticos, tumores de células germinales, tumores linfoides/mieloides y tumores secundarios (metástasis)²

Los tumores epiteliales son los más frecuentes, y pueden subclasificarse según su célula de origen en tumores de células escamosas (que representan aproximadamente el 80% de los casos), glandulares (15%) y neuroendocrinos (5%).

En la presente tesis nos centraremos sobre todo en los carcinomas escamosos y sus lesiones precursoras, que son los tipos más frecuentes.

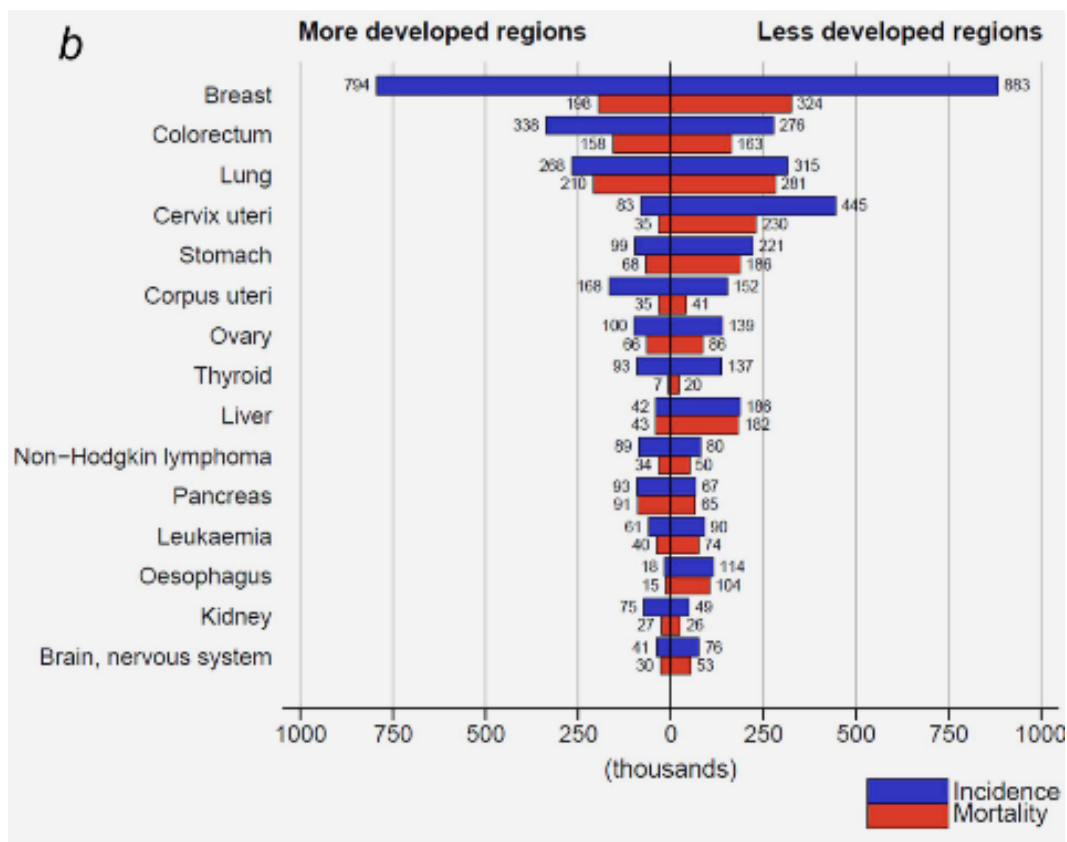


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cánceres en mujeres en todo el mundo en el año 2012 (*Ferlay et. al 2015*)

2. Lesiones precursoras e historia natural del cáncer de cuello de útero

2.1 Definición y clasificación de las lesiones escamosas intraepiteliales

Prácticamente todos los CCU se originan a partir de lesiones precursoras. La terminología utilizada para designar estas lesiones ha ido variando en el tiempo paralelamente al conocimiento tanto de las lesiones, como de su agente causante y su evolución natural.

Reagan y colaboradores³ introdujeron el término de “*displasia*”, que comprendía un amplio espectro de lesiones desarrolladas entre el epitelio normal y el carcinoma *in situ*. Según la severidad de la displasia, ésta se gradaba en tres grupos: leve, moderada y severa. Esta clasificación fue un intento de reflejar su menor o mayor potencial de progresión a carcinoma *in situ* e invasor. Años más tarde, a la luz de los conocimientos adquiridos sobre la biología de las lesiones precursoras, Richart introdujo el término neoplasia cervical intraepitelial (CIN, del inglés *cervical intraepithelial neoplasia*). Las CIN se graduaron, también en función de la severidad de la lesión y el riesgo de progresión a cáncer, en lesiones de grado 1 (CIN1) , 2 (CIN2) o 3 (CIN3). En esta perspectiva, la CIN se definía como un espectro de lesiones preneoplásicas que compartían una etiología, una biología y una historia natural comunes^{4,5}.

Posteriormente, el National Cancer Institute Workshop, en 1989, en el conocido como “sistema de clasificación de Bethesda”, propuso una nueva clasificación para las lesiones citológicas, basándose en la historia natural de la infección por el virus del papiloma humano (VPH), agente etiológico responsable del desarrollo de las mismas, y aplicando los términos de lesión escamosa intraepitelial (SIL del inglés *Squamous Intraepithelial Lesion*). En esta clasificación las lesiones se agrupan en dos categorías: SIL de bajo grado (LSIL, del inglés, *low grade-SIL*) y SIL de alto grado (HSIL, del inglés, *high grade-SIL*), acorde con los conocimientos biológicos de estas lesiones.

Durante años, los términos LSIL y HSIL se reservaron para designar las alteraciones citológicas, mientras que la terminología histológica siguió utilizando el término de CIN1, 2 o 3, en función del grado de alteración tisular.

En el año 2012, el Colegio Americano de Patología (CAP) y la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP) establecieron, mediante un panel de expertos, un consenso con el fin de crear una terminología que reflejase los conocimientos actuales de la biología de estas lesiones, facilitase la comunicación entre los especialistas médicos y fomentase el uso óptimo de los biomarcadores moleculares utilizados en este tipo de lesiones. Este consenso dio lugar a la denominada terminología LAST (LAST, del inglés, *Lower Anogenital Squamous Terminology*)⁶. La terminología LAST propone utilizar la misma terminología (LSIL y HSIL) para todas las lesiones escamosas intraepiteliales asociadas al VPH, independientemente de (1) su identificación en muestras citológicas o histológicas y (2) su localización en cuello de útero, vulva, vagina, ano, región perianal o pene. La información se complementa con la terminología clásica “neoplasia intraepitelial” (IN) y la sigla correspondiente a su localización (cuello de útero CIN, vagina VaIN, vulva VIN, ano AIN, área perianal PaIN y pene PeIN), acompañada de la gradación (-IN1, 2 o 3) entre paréntesis en el caso de que sea un diagnóstico histológico.

Esta nueva clasificación ha sido aceptada por la Organización Mundial de la Salud como terminología oficial en el año 2014². Por tanto, actualmente las lesiones CIN 1 se clasifican como LSIL y las lesiones CIN 2 y CIN 3 se clasifican como HSIL⁶.

2.2 Riesgo de progresión a cáncer de cuello de útero

Más del 60-80% de las LSIL/CIN1 regresan espontáneamente y sólo un pequeño porcentaje de entre 5-10% progresan a HSIL/CIN2-3. La capacidad de regresión de estas lesiones parece ser mayor en adolescentes y mujeres jóvenes, estimándose que el 91% lo resolverá en un periodo medio de 36 meses. Sin embargo, a medida que aumenta la edad la probabilidad de regresión es menor. Por el contrario, el riesgo de transformación a carcinoma invasor de las HSIL/CIN2-3 es elevado (alrededor del 30% a corto plazo y 50% a largo plazo)⁷. Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por VPH precede a la regresión de los cambios citológicos.

3. El virus del papiloma humano

A día de hoy, sabemos que el virus del papiloma humano (VPH) es el factor etiopatogénico necesario para el desarrollo del cáncer de cuello de útero y sus lesiones precursoras. Las primeras aportaciones con base científica sobre la relación causal entre este virus y algunas neoplasias datan de mitad del siglo pasado. En el año 1949 fue la primera vez que se visualizó partículas de este virus en verrugas humanas. Unos años más tardes, en 1965, se caracterizó su genoma y no fue hasta la década de los 70s cuando se sugirió por primera vez, gracias a los trabajos de Zur Hausen, su posible papel en el desarrollo de las neoplasias cervicales y sus lesiones precursoras^{8,9}. Posteriormente se identificaron diferentes genotipos, a los que se denominó alto riesgo oncogénico, y dado el auge de la investigación científica en este campo se concluyó a principio de los años 90s que el VPH era en principal factor etiológico, no sólo del cáncer de cuello de útero, sino

también de un alto porcentaje de otras neoplasias de tracto anogenital, tanto femenino como masculino, como vulva, vagina y pene¹⁰⁻¹².

3.1 Estructura y genoma viral

Los VPH son miembros del género de conforman la familia *papovaviridae*. Son virus de ADN de pequeño tamaño, aproximadamente 55 nm, formados por una estructura muy simple con una cápside icosaédrica de 72 capsómeros en torno a una doble cadena de ADN circular de unas 8.000 pares de bases. Constan de varios genes u ORF (*Open Reading Frames*) de dos tipos diferentes: hasta 7 genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral; y dos genes de expresión tardía (L1 y L2), cuya expresión genera las proteínas para el ensamblaje de la cápside. Una región de control denominada LCR (*Long Control Region*), es la encargada de controlar la expresión de los genes E6 y E7 (*Figura 2*).

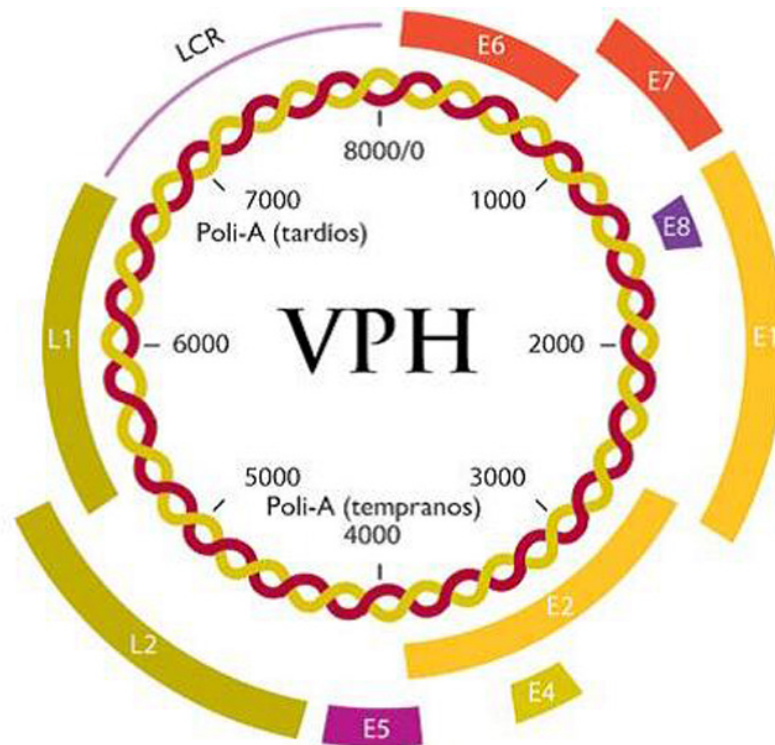


Figura 2. Genoma del virus del papiloma humano (*Beltrán-Lissabet 2014*)

La proteína mayor de la cápside o L1 tiene la característica de autoensamblarse con otras L1 constituyendo pentámeros que a su vez se autoensamblan hasta formar una cápside icosaédrica constituida por 72 pentámeros. La proteína menor de la cápside o L2 ocupa el centro de los pentámeros y da estabilidad a la cápside. Cuando el VPH es expuesto al sistema inmune la proteína L1 representa la mayor exposición antigénica y condiciona una respuesta inmune específica para cada genotipo de VPH (anticuerpos específicos de grupo). Por otra parte, la proteína L2, que es más pequeña, induce una respuesta inmune de menor intensidad, pero más inespecífica e independiente del genotipo viral particular.

La proteína E1-E4, mayoritariamente expresada en epitelios infectados por VPH (aproximadamente el 30% de contenido proteico celular),

se sintetiza como proteína mixta, involucrando regiones génicas de E1 y E4, formando complejos hexaméricos capaces de unirse a la red de citoqueratina de la célula, que pierde soporte estructural. E4 se expresa en gran cantidad en las lesiones condilomatosas.

La proteína E2 es dimérica y forma un complejo proteico con E1. Ejerce una represión continua de la transcripción de los oncogenes E6 y E7. Concretamente, E2 reprime un promotor encargado de iniciar la expresión de E6 y E7, reduciéndose de esta manera la síntesis de las proteínas dependientes pE6 y pE7. E2 activa directamente la síntesis de la proteína p53 lo que provoca la detención del ciclo celular en G1 y conduce a la célula a la apoptosis.

Las proteínas E6 y E7 de los VPH oncogénicos tienen que ver con las propiedades de transformación e inmortalización de las células infectadas. Existen diferencias en cuanto a la capacidad proliferativa de E6 y E7. La sobreexpresión de E7 conduce a proliferación, mientras E6 tendría menor importancia individualmente, pero potencia la acción de E7¹³.

3.2 Genotipos virales

Los VPH se clasifican en tipos, subtipos y variantes en función de la homología de la secuencia de bases del ADN del gen L1. Se define un nuevo genotipo cuando la diferencia en el genoma con los demás tipos es superior al 10% y se cataloga como subtipo cuando esta diferencia es del 2-10%. En base a la homología del genoma se agrupan en distintas familias o ramas filogenéticas.

Los distintos virus tienen tropismo de especie y organoespecificidad, con aptitud tisular epitelial¹⁴. Los distintos grupos tienen tropismos distintos y causan lesiones anatómicas e histológicas de diferente índole. Los diferentes VPH se clasifican en:

Grupo cutáneo: Se aíslan en verrugas cutáneas y plantares. A este grupo pertenecen los tipos 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 26-29, 32, 38, 41, 49 y 65.

Grupo asociado a epidermodisplasia verruciforme: Se aíslan en lesiones de pacientes con epidermodisplasia verruciforme, en lesiones cutáneas de pacientes inmunodeprimidos y en algunos tumores epiteliales. A este grupo pertenecen los tipos 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 47, 50.

Grupo anogenital: Son virus de transmisión sexual con tropismo por las mucosas. Este grupo se divide en virus de bajo (VPH-BR) y alto riesgo (VPH-AR). Entre los VPH-BR, los genotipos más representativos son el 6 y el 11, se identifican en lesiones proliferativas benignas (condilomas) del tracto anogenital de ambos sexos. Los VPH-AR, representados principalmente por los genotipos 16 y 18, pero también 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 se consideran los principales factores etiopatogénicos de las neoplasias del tracto genital inferior. Los tipos 26, 53 y 66 son también probablemente genotipos de alto riesgo (*Figura 3*).

Riesgo	Tipos de VPH	Manifestaciones clínicas
Alto	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	Lesiones genitales de bajo riesgo Lesiones genitales de alto riesgo Cáncer cervical Cáncer de vagina, vulva, ano y pene Cáncer de orofaringe Cáncer de cavidad oral y laringe
Bajo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108	Lesiones genitales de bajo riesgo Lesiones genitales de alto grado Condilomas acuminados (verrugas genitales) Papilomatosis respiratoria recurrente
Intermedio	26, 53, 66	Cáncer cervical

Figura 3. Clasificación epidemiológica de los genotipos de VPH asociados a enfermedad clínica (Reina et al. 2008)

En diversos estudios se ha demostrado la presencia de secuencias genómicas de VPH en casi el 100% de los carcinomas invasores de cuello de útero, en un porcentaje casi igual de lesiones premalignas cervicales escamosas y en un elevado porcentaje de neoplasias y lesiones premalignas del área anogenital . Ocasionalmente, este grupo se aísla en lesiones de la mucosa de la cavidad oral y orofaringe, y en menor frecuencia en lesiones de laringe y esófago¹⁵.

3.3 Mecanismo de carcinogénesis

Los papillomavirus están perfectamente adaptados a la célula epitelial, el queratinocito. El virus utiliza el proceso de diferenciación de la célula infectada para activar la máquina de replicación celular en su propio beneficio.

Mediante la hibridación *in situ* se ha demostrado la expresión secuencial de los genes virales, la replicación del genoma, la síntesis de proteínas derivadas de genes precoces (E6, E7, E2, E4) y genes tardíos (L1, L2), la encapsulación del genoma, y la liberación de los viriones a medida que se exfolian las capas superficiales del epitelio¹⁶.

El ciclo comienza cuando las partículas infecciosas llegan a la capa basal del epitelio, se unen a las células y penetran en su interior. Para mantener la infección, el virus ha de infectar una célula basal con capacidad de replicación. El virus se establece en las células basales en forma de episomas (ADN no integrado), con algunas decenas de copias de genoma viral por célula que se replican coordinadamente, y durante períodos variables de tiempo mantiene este bajo número de copias en estas células que están infectadas pero que todavía son competentes y pueden replicarse. Durante la persistencia viral, el sistema inmune mantiene la infección en este estado. Más tarde, la célula basal comienza a diferenciarse y es impulsada hacia estratos superiores de la epidermis/mucosa. En el compartimento suprabasal, esta célula pierde la capacidad de dividirse. Es en este estrato donde el VPH comienza a replicarse amplificando el genoma viral y produciendo también las proteínas de la cápside con la consecuente aparición de viriones que aprovechan la desintegración natural del queratinocito propio del recambio de las capas superficiales para liberarse al entorno. Las células superficiales en las que se acumulan numerosos viriones completos muestran características morfológicas peculiares y reciben el nombre de coilocitos¹⁷ (*Figura 4*).

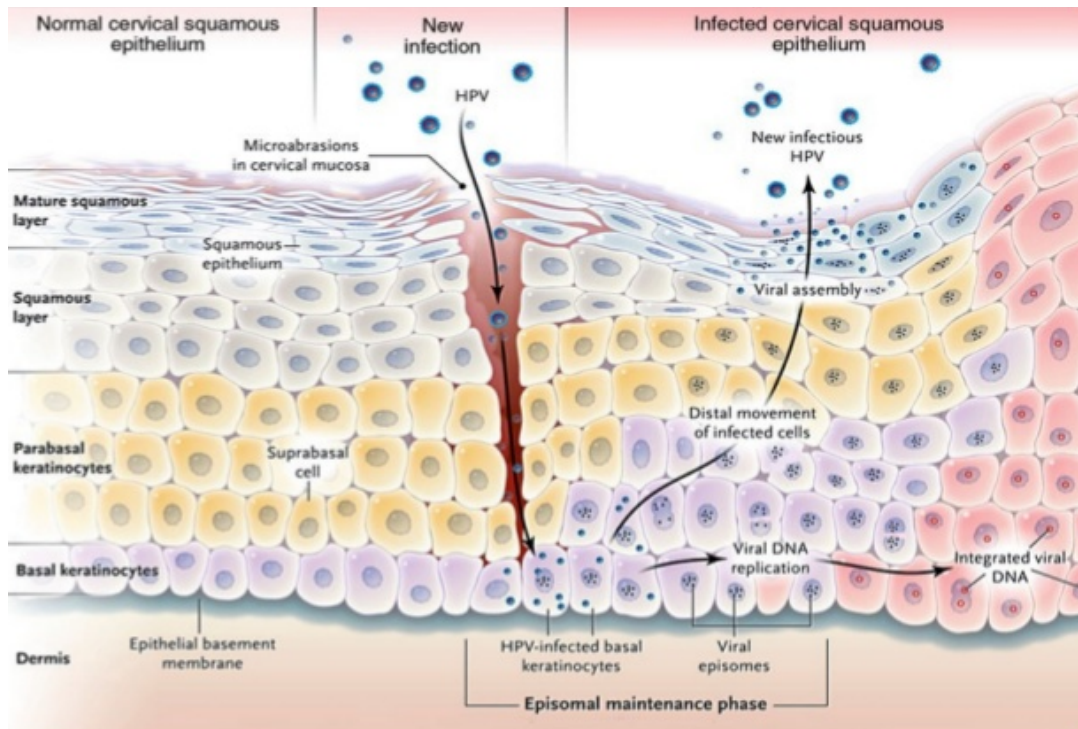


Figura 4. Infección y replicación viral del VPH (Ciaran et a. 2007)

Las lesiones cervicales de bajo grado (condilomas acuminados o LSIL/CIN1), son el prototipo de esta forma de infección denominada productiva. En ellas tiene lugar la producción de grandes cantidades de viriones completos. El patrón de diferenciación del epitelio escamoso infectado es similar al patrón de diferenciación del epitelio normal, observándose células inmaduras de tipo basal confinadas en el tercio inferior del epitelio y una correcta maduración en la superficie.

Por otro lado, el genoma viral es capaz de integrarse en la célula huésped, fenómeno que ocurre en la mayor parte de los carcinomas y un porcentaje importante de las lesiones de alto grado. La integración del genoma vírico en el ADN de la célula huésped y la consiguiente sobreexpresión de E6 y E7 constituyen elementos esenciales del proceso

oncogénico. La integración de las secuencias de VPH ocurre en ciertas regiones susceptibles del genoma de baja condensación, susceptibles de ruptura. La consecuencia de la inserción, tras la rotura a nivel de E1-E2 conduce a la sobreexpresión de E6 y E7. Los oncogenes virales E6 y E7 modifican el ciclo celular, consiguiendo mantener el queratinocito diferenciado en un estado propicio para la replicación del genoma viral y la expresión tardía de los genes estructurales^{18,19}.

La proteína diana más importante de E7 es el producto del gen supresor tumoral proteína del retinoblastoma (pRb), y además, las proteínas asociadas p107 y p130. La pRb es uno de los principales reguladores del ciclo celular, que funciona uniéndose e inhibiendo la actividad del factor de transcripción E2F. Cuando pRb libera E2F, éste activa la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y en la síntesis de ADN. E7 se une a pRb, inactivándolo, de manera que la célula entra en la fase S del ciclo celular y se activa la maquinaria de replicación del ADN, necesaria para la amplificación del genoma viral.

Por su parte, el producto del gen E6 se caracteriza por su capacidad de mediar la destrucción de la proteína p53, a través de la vía proteolítica mediada por ubiquitina. La proteína p53 es el producto de otro gen supresor tumoral, que se ha denominado *el guardián del genoma*, por su función central en la reparación del ADN dañado y la activación de la apoptosis cuando las lesiones no pueden repararse. La proteína p53 es por ello, fundamental para mantener la integridad del genoma y destruir las células dañadas, potencialmente oncogénicas. La función principal de E6 es dirigir la degradación de p53, de manera que se inhibe la apoptosis de la célula

infectada, manteniéndola con vida hasta que ha generado una cantidad suficiente de progenie viral.

La acción conjunta de E7 (inhibiendo pRb) y E6 (degradando p53) produce un efecto sinérgico en la activación del ciclo celular, dando como resultado la proliferación descontrolada de las células infectadas por el virus que, asociado al efecto antiapoptótico resultante de la inactivación de p53, es una potente combinación oncogénica (Figura 5).

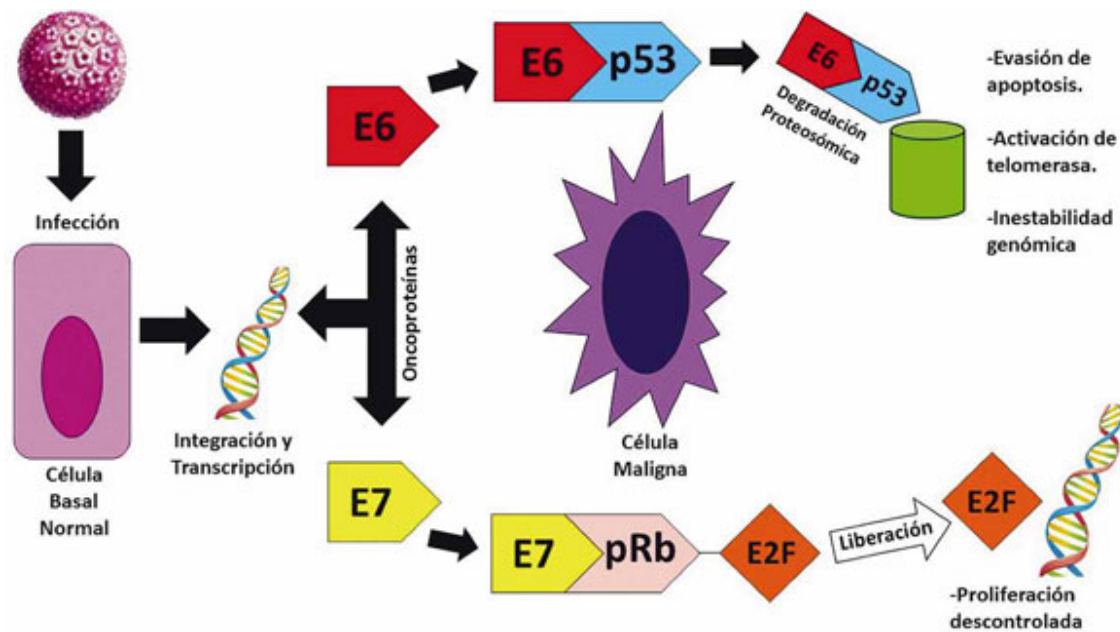


Figura 5. Oncogénesis mediada por E6 y E7 (Contreras et al. 2015)

Sin embargo, el objetivo final del virus no es inducir una transformación maligna en la célula huésped, sino replicar su genoma para finalizar un ciclo de vida productivo; y para replicarse en células diferenciadas, el virus debe actuar sobre las vías indicadas. Las células que han sido transformadas por el VPH en células cancerígenas son incapaces

de replicar el genoma viral, ya que sólo contienen la parte del genoma del virus que se ha integrado, por lo que el virus no puede replicarse de forma independiente ni generar viriones. Por ello, sólo una pequeña proporción de individuos infectados con VPH presentan neoplasias malignas, ya que la integración del ADN viral en el genoma celular es un suceso que ocurre con muy baja frecuencia²⁰.

3.4 Epidemiología de la infección por VPH

La infección por el VPH se transmite principalmente a través de las relaciones sexuales debido al contacto de piel con piel o mucosa con mucosa. Por tanto, el inicio precoz de las relaciones sexuales, el número de parejas sexuales previas y actuales favorecen la infección por el VPH. La prevalencia de estas infecciones es más alta entre aquellas mujeres sexualmente más activas que se suelen encontrar en su segunda década de vida. Con el incremento de la edad, las mujeres tienden a tener menos nuevas parejas sexuales y la prevalencia de la infección disminuye. Después de los 45 años de edad, las infecciones por VPH de alto riesgo (VPH-AR) tienden a estabilizarse, y menos del 5% de las mujeres en la población general son positivas para VPH-AR²¹.

La circuncisión masculina y el uso de preservativo de forma habitual reducen en aproximadamente un 40% la transmisión del virus. Se estima que el porcentaje de mujeres sexualmente activas con infecciones anogenitales por VPH a lo largo de la vida es del 80%. El pico de incidencia de infección se da entre los 16 y 20 años coincidiendo con las primeras relaciones sexuales^{22,23}.

Entre los órganos más susceptibles de infección con riesgo de iniciar una transformación neoplásica se encuentra el cuello de útero uterino, a través del epitelio metaplásico de la unión escamo-columnar. El VPH infecta las células basales de esta unión, que son las que poseen capacidad de replicación ²⁴.

Alrededor del 90% de las infecciones por VPH son transitorias y se resuelven espontáneamente en una mediana de tiempo de 12 meses, aunque algunos genotipos como el 16 pueden permanecer más tiempo. Sin embargo, muchas mujeres que aclaran espontáneamente un tipo específico de VPH vuelven a infectarse con otro genotipo. Esto es parte de la explicación de que la infección por múltiples genotipos de VPH sea más frecuente en adolescentes y mujeres jóvenes ^{25,26}. Además, la probabilidad de aclaramiento de la infección disminuye con la gravedad de la lesión intraepitelial ^{27,28} (Figura 6).

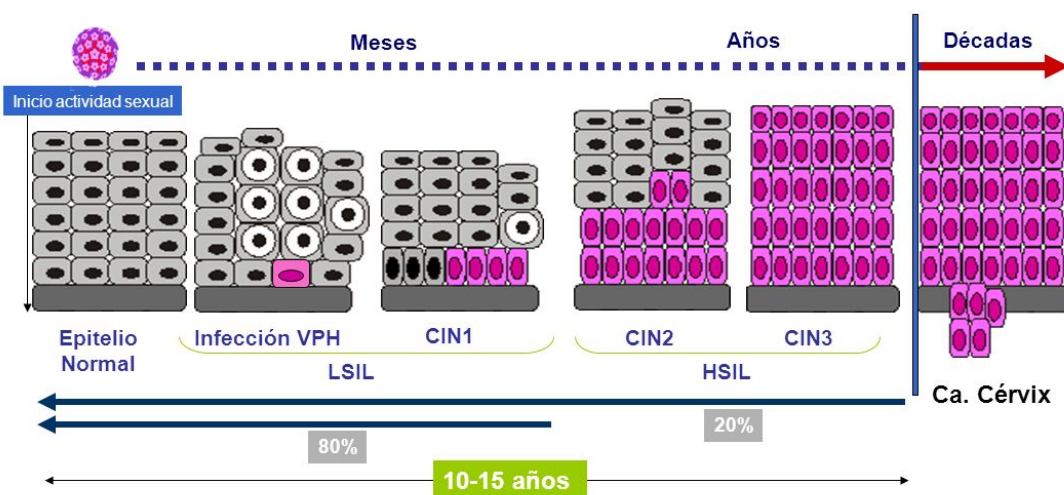


Figura 6. Historia natural del cáncer de cuello de útero (Chumacero Sánchez 2014)

De entre las mujeres infectadas por VPH que se convierten en VPH-negativas, no todas presentan un aclaramiento viral completo. Un porcentaje de ellas continúan teniendo un bajo número de copias del genoma viral en las células basales del epitelio escamoso que no son detectadas usando pruebas de detección molecular estándar (infecciones bajo control inmunológico). La reactivación de una infección latente por VPH secundaria a la senescencia, dirigida por la inmunidad celular, podría fácilmente explicar muchas de las infecciones por VPH que son detectadas en mujeres ancianas con una historia de cribado previamente negativa sin nuevas parejas sexuales²⁹.

La infección del VPH es una infección de la mucosa en la que no existe fase de diseminación hematológica. Sólo un 50% de las mujeres desarrollan anticuerpos que no son necesariamente anticuerpos neutralizantes capaces de ofrecer protección contra nuevas infecciones. Sin embargo, la resolución de la infección parece conferir un cierto grado de protección contra infecciones por los mismo genotipos y cruzada entre distintos genotipos.

Sólo un pequeño porcentaje de infecciones por VPH-AR progresan a cáncer invasor, siendo éste un proceso multifactorial en el que se acaban produciendo múltiples alteraciones que afectan a la estructura y expresión de oncogenes y genes supresores de tumores de la célula huésped infectada.

Los determinantes conocidos de progresión son el genotipo viral, la persistencia de la infección, la carga viral por unidad celular y la integración del ADN vírico en el ADN celular. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye un factor de riesgo para la

infección y la progresión neoplásica. El uso prolongado de anticonceptivos orales, la alta paridad y el tabaquismo son factores adicionales establecidos de progresión. Y son posibles factores de progresión las dietas pobres en fruta y verdura y la co-infección por otras enfermedades de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* y Virus Herpes Simple tipo 2 (VHS-2). Las características morfológicas de las lesiones no permiten identificar qué lesiones progresarán a carcinoma invasor. Se han realizado numerosos estudios con modelos *in vitro* para identificar los elementos necesarios para la progresión de las lesiones intraepiteliales a cáncer y se han descrito diversas alteraciones génicas implicadas en la transformación maligna. Gracias a la identificación de estos marcadores moleculares de progresión, hoy en día se denomina **lesiones productivas** a aquellas que regresarán y **lesiones transformantes** a aquellas con capacidad de progresión. Por tanto, existe consenso en tratar únicamente las lesiones transformantes y en realizar un seguimiento en las lesiones productivas hasta verificar su resolución

3.5 Papel del VPH en el cáncer de cuello de útero y sus lesiones precursoras

Los principales mecanismos biológicos mediante los cuales el VPH induce al cáncer en humanos y las bases genéticas y moleculares de su carcinogénesis se han conocido en los últimos años gracias a la identificación de la expresión de las proteínas oncogénicas virales codificadas por los genes E6 y E7 en tejido neoplásico y no en tejido sano, a la comprobación de la capacidad transformadora de estas oncoproteínas para bloquear las

proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y proteína del retinoblastoma (pRb) y a la demostración de que la expresión mantenida de E6 y E7 es un requisito indispensable para mantener el fenotipo maligno de las células neoplásicas^{30,31}.

La naturaleza causal de la asociación entre el VPH y el cáncer de cuello de útero se fundamenta, además de en el conocimiento de las bases moleculares que demuestran el potencial carcinogénico del VPH, en la detección regular de ADN viral en las células cancerígenas del cuello de útero uterino (prácticamente en el 100% de los casos) y lesiones precursoras (95-100%) y los resultados de múltiples estudios epidemiológicos realizados en diferentes poblaciones y con diferentes diseños que demuestran de forma coherente que la persistencia de ciertos tipos virales son el principal factor de riesgo para el desarrollo del mismo. Además, estudios prospectivos evidencian que la infección persistente por virus de alto riesgo preceden la aparición de CIN, y es necesaria para el desarrollo, mantenimiento y progresión de estas lesiones²⁹.

4. El cribado del cáncer de cuello de útero y diagnóstico de sus lesiones precursoras

4.1 Métodos de detección de VPH

4.1.1. Métodos morfológicos

Clásicamente, el diagnóstico de la infección por VPH se ha realizado mediante la identificación morfológica de las alteraciones citopáticas producidas por el virus en las células escamosas, siendo la coilocitosis el

signo morfológico característico. Estas alteraciones morfológicas pueden identificarse tanto en la citología como en las muestras histológicas. La presencia inequívoca de coilocitos indica infección viral productiva, que en realidad, son mucho más frecuentes en las lesiones de bajo grado que en las de alto grado. De hecho, la mayoría de lesiones escamosas de alto grado, carcinomas escamosos invasores y todas las lesiones glandulares (adenocarcinomas *in situ* e invasores) no contienen habitualmente coilocitos. Es pues, un método muy poco sensible sobre todo teniendo en cuenta que hoy en día las técnicas de biología molecular tienen una sensibilidad de casi el 100%.

4.1.2. Métodos de detección de proteínas virales

La demostración de la infección del VPH puede efectuarse detectando las proteínas de la cápside mediante inmunohistoquímica. Este método tiene la misma baja sensibilidad que el estudio morfológico de coilocitos. Dado que la producción de la cápside tiene lugar sólo en las células maduras superficiales, la proporción de casos positivos es inversamente proporcional al grado de lesión, siendo casi constantemente negativo en los casos de carcinomas invasores.

4.1.3 Métodos de biología molecular

A lo largo de los últimos años, diversos estudios aleatorizados que incluyen entre todos más de 50.000 mujeres, han analizado la capacidad de la determinación de secuencias genómicas del VPH-AR para detectar lesiones premalignas de alto grado en comparación con la citología. Todos

estos estudios concluyen que estos test son más sensibles que la citología, aumentando la tasa de detección de HSIL/CIN2-3 o CCU y contribuyen a la reducción de la incidencia de estos casos en los cribados posteriores³²⁻³⁵.

La elevada sensibilidad de las pruebas de detección del ADN del VPH-AR se traduce en un valor predictivo negativo cercano al 100% en mujeres mayores de 30 años, lo que significa que una determinación negativa implica una muy baja probabilidad de tener un HSIL/CIN2+ subyacente en los próximos 5-7 años³⁶. Tras un resultado negativo de la prueba VPH-AR, el riesgo de desarrollar un HSIL/CIN2-3 en los siguientes 6 años es del 0,27%. La estimación de riesgo para el mismo periodo tras una citología negativa es de 0,97%³⁶. Ello permite espaciar de forma segura el intervalo de cribado en aquellas mujeres con una prueba VPH-AR negativa. Los trabajos realizados muestran que existe una menor incidencia de CCU después de 5 años de una prueba VPH-AR negativa que tras 3 años de una citología negativa³⁷. Ahora bien, este incremento de sensibilidad con respecto a la citología, se acompaña de una reducción de alrededor de un 4-6% de la especificidad y una reducción de un 10-20% del valor predictivo positivo comparado con la citología^{38,39}, debido a que la técnica detecta un número muy significativo de mujeres con infección por VPH que resolverán la infección sin desarrollar ninguna lesión cervical, hecho evidente, sobretodo, si se utiliza en mujeres jóvenes.

Además, la prueba VPH-AR incrementa sustancialmente de detección de adenocarcinomas cervicales y sus lesiones precursoras. La incidencia de este subtipo de neoplasia cervical permanece estable o incluso ha aumentado en algunos países en los que el cribado se basa exclusivamente

en la citología, ya que este método es muy poco sensible para su detección^{37,40}.

Otra ventaja de la prueba VPH-AR frente a la citología es su mayor reproducibilidad.

A continuación se describen las diferentes técnicas de detección molecular del VPH utilizadas en el cribado de CCU junto con la citología cervical.

4.1.3.1 Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* se basa en el uso de sondas marcadas que hibridan específicamente con el ADN del VPH-AR situado intracelularmente. Esta técnica puede realizarse tanto en muestra citológica como histológica. Existen diferentes kits comercializados que incluyen un cóctel de sondas que permite detectar un amplio grupo de genotipos sin diferenciarlos y otros para tipificación.

La principal ventaja de la hibridación *in situ* es que permite visualizar la morfología de las células infectadas por el VPH. La segunda ventaja es su gran especificidad: la detección de VPH-AR mediante esta técnica se asocia constantemente a la presencia de lesiones cervicales. Las infecciones latentes en un epitelio normal son casi constantemente negativas con esta técnica¹⁸.

El gran inconveniente de esta técnica es su baja sensibilidad (al alrededor de un 40-70% de las SIL/CIN), debida a que se necesitan un número elevado de copias para que sea posible su detección, lo que hace poco útil esta técnica en el cribado del CCU⁴¹.

4.1.3.2 Captura de híbridos

Es el método más contrastado y experimentado. Se comercializa el kit Hybrid Capture 2 (HC2) aprobado por la FDA y sólo se aplica sobre células en suspensión, no permitiendo su uso en muestras tisulares. Este método utiliza sondas de ARN capaces de detectar diferentes tipos de VPH-AR sin indicar el genotipo específico. Cuando existe infección vírica las sondas de ARN forman un híbrido con el ADN del virus. Este híbrido es capturado por un anticuerpo específico y detectado mediante técnicas de ELISA que utilizan un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y que proporciona además una información semicuantitativa sobre la cantidad de ADN viral según la intensidad de la reacción medida en unidades relativas de luz. La técnica dispone de una sonda para 13 virus de alto e intermedio riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y otra para 5 virus de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) responsables del 90% de CCU⁴².

Este método se considera muy adecuado para el cribado por su alta sensibilidad. Debido a que es la técnica más contrastada, muchos autores recomiendan utilizar el HC2 como patrón modelo para realizar estudios comparativos de los nuevos métodos de cribado⁴³. Sin embargo, es un método relativamente poco reproducible en la llamada “zona gris”, que afecta a los resultados alrededor del punto de corte (positivo/negativo)⁴⁴.

4.1.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Estos métodos se basan en la amplificación del ADN del virus mediante la aplicación de unos cebadores complementarios de secuencias

del ADN vírico, en ciclos de altas y bajas temperaturas y gracias a la acción de polimerasas del ADN, para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular partiendo de un mínimo. Estas técnicas pueden utilizarse en cualquier tipo de muestra, como células en suspensión, células sobre portaobjetos o cortes de muestras histológicas.

Existen dos alternativas fundamentales para la detección de VPH mediante la PCR. En primer lugar, y como método más utilizado, disponemos de la **PCR de regiones de consenso**, en la que se amplifica una región con una secuencia muy similar entre todos los VPH para, posteriormente, por métodos de hibridación específica, enzimáticos o de secuenciación del ADN, realizar la tipificación del virus. El primero de estos métodos de consenso que fue popularizado fue el que utiliza como diana de amplificación la región común de L1, utilizando las sondas MY09 y MY11. El producto amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases y presenta ciertos inconvenientes, como no permitir la detección de determinados VPH (VPH 35) y de tener una sensibilidad limitada debida, entre otras cosas, a que su relativo gran tamaño, en casos de ADN de mala calidad, hace que la amplificación se vea muy limitada.

Para mejorar estas limitaciones posteriormente se realizaron diferentes modificaciones que básicamente radicaban en el diseño de nuevas sondas para la misma diana. Así se diseñaron variantes como PGMY09/11, que proporcionaba una mayor sensibilidad y un aumento del espectro de VPH detectados, u otros como GP5/GP6 o su variante mejorada GP5+/GP6+, cuya sensibilidad respecto a otros cebadores consenso es notablemente mayor.

La **PCR específica** está basada en el diseño específico de cebadores para regiones diferenciales entre los diferentes VPH, y en él cabe destacar su extremada sensibilidad, ya que se pueden amplificar específicamente por ejemplo oncogenes virales (E6 y E7) de un determinado tipo, subtipo o variante viral con una especificidad de casi el 100%. Por otro lado permiten la realización de análisis de integración viral, detección de variantes, etc.

Estos métodos son extraordinariamente sensibles, pero pueden tener problemas de especificidad, dado que ocasionalmente se detectan secuencias similares pero no exactas del ADN problema debido a la contaminación incurriendo en falsos positivos.

Actualmente existen un alto número de test basados en PCR como GP5+/GP6+, PGMY09/11, SPF, Amplicor MWP, Linear Array, Inno-Lipa, PapilloCheck y Cobas 4800. Este último está aprobado por la FDA como prueba única para el cribado de CCU, siendo un método automatizado que informa si la muestra es positiva o negativa para VPH-AR y, en casos positivos, indica si está presente el VPH 16, el VPH 18 u otro de los siguientes VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 o 68)⁴⁵.

4.1.3.4. Detección de ARN vírico

La detección del ARN mensajero (ARNm) de los oncogenes E6 y E7 supone un arma diagnóstica mucho más específica que la simple detección del ADN viral. Su identificación significa que ha existido una integración del material genético viral en el ADN celular y que se está produciendo además la expresión del ADN viral.

De entre los métodos de detección de ARN del VPH, Aptima®, un sistema automatizado que permite la detección de 14 tipos de VPH-AR, está aprobado por la FDA y validado en la plataforma Panther como co-test (asociado a la citología) y para la selección de las citologías de ASC-US^{46,47}.

Diversos trabajos correlacionan la expresión del ARNm de E6 y E7 con el grado lesional, otorgándole a esta técnica un papel como marcador con valor pronóstico, además como herramienta para cribado primario⁴⁸⁻⁵⁰.

La prevención secundaria del CCU durante muchos años se ha basado en la detección de lesiones premalignas de mujeres asintomáticas mediante citología cervical. Las mujeres con cribado positivo se someten a un estudio colposcópico y biopsia y si se confirma HSIL/CIN2-3 habitualmente se indica tratamiento para la eliminación de la lesión o, seguimiento estricto hasta evidenciar regresión de la lesión en casos muy seleccionados. Esta iniciativa ha logrado una disminución significativa en la incidencia y la mortalidad del CCU en los países en los que se ha implementado de forma sistemática. Sin embargo, el efecto sobre la reducción de la mortalidad de esta estrategia de cribado ha llegado a su límite⁵¹. En la última década, numerosas guías clínicas Europeas y Americanas (ACOG, 2003; ASCCP, 2004; IARC, 2004; SEGO, 2006; USPSTF 2009; AEPCC 2014) proponen la utilización de la prueba VPH (para la detección de VPH-AR) a partir de los 30 años como herramienta de cribado primario, además de para la selección de mujeres con lesiones cervicales o seguimiento de las pacientes tratadas.

A continuación, se exponen las pruebas para la detección del VPH aprobadas por la FDA para cribado poblacional (*Tabla 1*).

Test	HPV types	Uses
Digene Hybrid Capture 2 high-risk HPV DNA test	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68	ASC-US triage Cotesting in women older than 30 years old
Cervista HPV HR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68	ASC-US triage Cotesting in women older than 30 years old
Cervista HPV 16/18	16, 18	Triage for follow-up of women older than 30 years old with negative cytology and positive high-risk HPV testing
Cobas HPV test	Specifically identifies 16 and 18 while concurrently testing for 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68	ASC-US triage Cotesting in women older than 30 years old Triage for follow-up of women older than 30 years old with negative cytology and positive high-risk HPV testing
APTIMA HPV assay	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68	ASC-US triage Cotesting in women older than 30 years old

Tabla 1. Pruebas VPH aprobadas por la FDA para cribado primario

4.2 La citología cervical

4.2.1. Citología convencional

Esta herramienta ha sido, desde su introducción a mediados del siglo XX, la principal herramienta en el cribado de CCU por su capacidad para la detección de sus lesiones precursoras y responsable del descenso de la

mortalidad cuando se ha incorporado en protocolos de cribado organizado⁵¹. Sin embargo, su sensibilidad para la detección precoz del CCU y sus lesiones premalignas es variable, incluso cuando se realiza con garantía de calidad⁵².

La citología convencional se basa en el estudio morfológico de las células obtenidas por rascado o cepillado de la superficie del exocérvix y endocérvix. Estas células presentan cambios morfológicos cuando son infectadas por el VPH, pero también por otros organismos, o cuando existen cambios en la flora vaginal normal. La muestra vaginal no tiene utilidad en el cribado de las lesiones cervicales. Únicamente en los casos de estenosis vaginal que impiden la visualización del cuello de útero, o bien en aquellas mujeres histerectomizadas en la que se realiza una toma única del fondo vaginal. La capacidad diagnóstica de los citotécnicos y citopatólogos se basa en saber distinguir aquellos cambios específicos de los inespecíficos y en graduar el daño celular, de manera que el resultado emitido permita decidir si la mujer padece o no el riesgo de desarrollar un cáncer en los próximos años. De este modo, se incide en el manejo de la paciente, siendo importante para decidir si debe realizarse un seguimiento o, por ejemplo, un estudio colposcópico para descartar un HSIL/CIN2-3 o un carcinoma invasor. Las bases para que el diagnóstico citológico sea de calidad son la experiencia de los profesionales tras un buen aprendizaje teórico y práctico, el establecimiento de criterios de calidad en los laboratorios y la monitorización constante de los resultados colectivos e individuales⁵³.

La sensibilidad de la citología para la detección de una lesión de alto grado (HSIL/CIN2-3) se sitúa alrededor del 50%, no superando el 80% en las mejores condiciones de calidad. Esta sensibilidad es de alrededor de un 40%

inferior a la de las pruebas clínicamente validadas para la detección de VPH⁵⁴. Diferentes factores explican esta subóptima sensibilidad: la variabilidad del material obtenido en la toma, a la calidad de la extensión citológica y a la preservación de la muestra, así como a la distinta capacidad de detección e interpretación de las características microscópicas por parte de los profesionales. Por tanto, es fundamental la habilidad y experiencia de quienes intervienen en todo el proceso. Se considera que 2/3 de falsos diagnósticos en citología ginecológica se deben a problemas en la toma, y la tercera parte restante a la interpretación microscópica⁵⁵.

La baja sensibilidad de una única citología se ha compensado aumentando la frecuencia de realización de la prueba, lo cual ha sido posible por su relativo bajo coste. Por otra parte, la especificidad de la citología es elevada, dado que el diagnóstico citológico es un diagnóstico morfológico de la lesión y no de una infección subclínica que puede no comportar alteraciones celulares a largo plazo. Sin embargo, esta especificidad puede verse afectada en función de la cantidad de diagnósticos indefinidos, como células escamosas atípicas de significado incierto (ASC-US), que emita cada laboratorio⁵².

4.2.2. Citología en medio líquido

Uno de los problemas de la citología convencional es que las extensiones realizadas manualmente dificultan mucho la visualización de todas las células (aproximadamente unas 300.000 por extensión). En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten obtener preparaciones en una sola capa celular, la llamada citología en monocapa, de

capa fina o en medio líquido. El material obtenido se conserva inmediatamente tras su extracción en un medio líquido, normalmente de base alcohólica, que permite su almacenamiento y transporte, y la extensión se realiza en el laboratorio. Los estudios publicados, incluyendo un metaanálisis, coinciden en que este tipo de citología disminuye los casos inadecuados para diagnóstico, en los que hay que repetir la toma de la muestra, acorta el tiempo de lectura al microscopio y ofrece un discreto aumento de la sensibilidad⁵⁶. Un valor añadido de la citología en medio líquido es que normalmente no se utiliza todo el material para realizar el estudio citológico, y el remanente conservado en el líquido de fijación durante semanas a temperatura ambiente permite realizar técnicas moleculares o de inmunohistoquímica, evitando así una nueva toma y, por tanto, una visita de la paciente, factor que debe tenerse en cuenta en el cálculo de eficiencia de esta técnica⁵⁷.

En los laboratorios, el uso de citología en medio líquido supone, por un lado, un incremento en las horas de procesamiento técnico, pero, por otro, disminuye el tiempo de estudio microscópico por parte de los citotécnicos, y, sobre todo, ofrece una interpretación más sencilla de la morfología celular, una vez se ha adquirido experiencia, debido a la disminución de los artefactos con respecto a las extensiones de citología convencional (sangre, inflamación, defecto de fijación)⁵⁸. Esta mejor calidad de la extensión ha permitido también la aplicación de la lectura automatizada con sistemas basados en análisis de imagen.

El uso de esta herramienta, de la que se comercializan varias versiones, se ha impuesto en la mayoría de los laboratorios de Europa y

Estados Unidos, siendo recomendado su uso por las ventajas descritas con respecto a la citología convencional⁵⁹.

4.3 La colposcopia

La colposcopia es una técnica de exploración óptica magnificada de los epitelios del cuello de útero, la vagina y la vulva con el objetivo de detectar lesiones premalignas e invasoras del tracto genital inferior, así como de orientar el tratamiento. La identificación de características epiteliales inapreciables a simple vista que traducen cambios patológicos permiten valorar el grado de anormalidad del tejido y localizar el área más sospechosa para obtener una biopsia.

La colposcopia permite diferenciar las dos fases de la historia natural de la neoplasia de cuello de útero. En la fase intraepitelial se observan lesiones acetoblancas debidas a la mayor densidad celular del epitelio que impide el paso de la luz hasta el estroma. Este es un signo poco específico pero que permite delimitar el área anormal. En la fase de invasión se observan vasos irregulares formados por la acción de factores angiogénicos y que constituyen un signo de progresión⁶⁰.

La colposcopia es una técnica con una elevada sensibilidad (95%), pero con una especificidad más baja que la citología (alrededor del 45%), dado que hay cambios anómalos que no corresponden a lesiones intraepiteliales⁶¹. Para cada imagen anómala existe una gradación que va desde cambios grado 1, más sugestivos de lesiones de bajo grado, hasta cambios grado 2, sugestivos de lesiones de alto grado o invasoras, de acuerdo con las características definidas en la clasificación de la *International*

*Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC)*⁶² (Tabla 2). Si no se visualiza la unión escamo-columnar, se considera que la colposcopia no es adecuada, siendo importante en estos casos descartar la existencia de una lesión localizada en el canal endocervical.

Hallazgos colposcópicos anormales	Principios generales	Localización de la lesión: Dentro o fuera de la ZT Tamaño de la lesión: Número de cuadrantes afectados. Porcentaje de cérvix afectado	
	Grado I	Epitelio acetoblanco fino, de aparición lenta y bordes geográficos, irregulares	Punteado fino Mosaico fino
	Grado II	Epitelio acetoblanco grueso, de rápida aparición. Criptas glandulares, irregulares e invaginadas	Punteado grueso Mosaico grueso Bordes definidos Signo Borde Interno (Blanco sobre blanco) Signo de la Cresta (Imágenes acetoblancas Sobreelevadas)
	Inespecíficos	Leucoplasia (hiperqueratosis). Erosión. Test de Schiller (Lugol): Iodonegatividad o no	
Sospecha de invasión		Vasos atípicos Signos adicionales: Vasos frágiles, superficie irregular, ulceración, necrosis, tumor exofítico	

Tabla 2. Nomenclatura IFCPC



Figura 7. Mosaico fino el labio anterior. Cambios menores (*Dexeus 2011*)

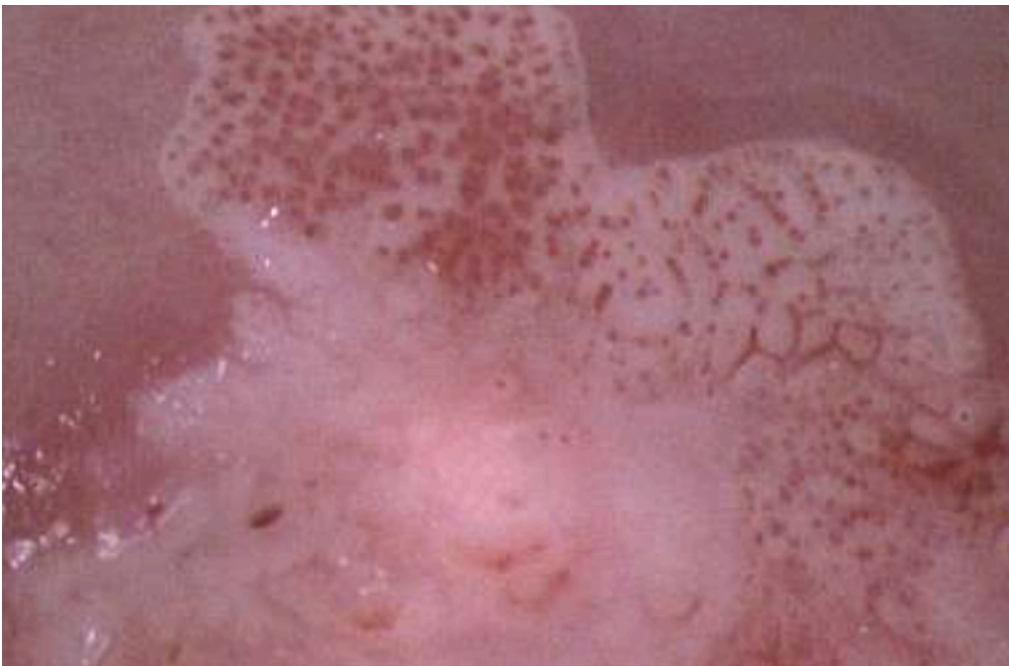


Figura 8. Punteado grueso. Cambios mayores (*Dexeus 2011*)

A pesar de ser el método diagnóstico de referencia, y que clásicamente se había considerado un método con una elevada sensibilidad, estudios recientes muestran que la sensibilidad de esta técnica para la detección de lesiones de alto grado es variable, y se ha sugerido que podría no detectar lesiones de alto grado presentes en hasta 30-55% de los casos⁶³. Por ello, diversos estudios proponen, con el objetivo de aumentar la sensibilidad diagnóstica de la colposcopia, tomar biopsias de áreas aparentemente no patológicas de la zona de transformación, lo que se ha definido como “ *biopsia at random*”^{63,64}. Esta recomendación ha sido incluida en las últimas guías clínicas de colposcopia publicadas^{65,66}.

Por otro lado, la especificidad de la colposcopia para el diagnóstico de lesiones HSIL/CIN2+ es menor que la de la citología (alrededor del 45%), dado que hay cambios anómalos que no corresponden a lesiones intraepiteliales⁶⁷.

Además, actualmente el rendimiento de la colposcopia en el diagnóstico de una lesión HSIL/CIN2+ ha sido discutido en los últimos años debido a la baja reproductividad de la colposcopia^{68,69}. La rigurosidad en la formación del colposcopista, así como la realización de la técnica por parte profesionales especializados son dos de los factores mas relevantes que impactan en la capacidad diagnóstica de la técnica⁷⁰.

4.4 Diagnóstico histológico

El diagnóstico anatomopatológico se considera diagnóstico final de las lesiones cervicales. Las lesiones asociadas a la infección por VPH se gradúan, como hemos comentado en capítulos anteriores, en función de su

riesgo de progresión en LSIL/CIN1 y HSIL/ CIN2+. Diferentes estudios han mostrado que, mientras que está clara la capacidad premaligna de las lesiones de CIN3, las lesiones de CIN2 constituyen un cajón de sastre, con lesiones cercanas a CIN1 con tendencia a la regresión y verdaderas lesiones premalignas similares a CIN3 ⁷¹. Actualmente, con la terminología LAST, la importancia de estas diferencias debería verse minimizada.

Los criterios utilizados para la clasificación diagnóstica son similares a los de la citología: alteraciones nucleares en forma de aumento del tamaño del núcleo, hiperchromasia o irregularidad del contorno. Estas alteraciones establecen el diagnóstico de SIL/CIN, la gradación de ésta se establece atendiendo a la gravedad de la alteración madurativa. Una limitación importante del examen histológico es que éste, a pesar de ser el diagnóstico de referencia, está sujeto a una moderada variabilidad inter e intraobservador, sobretodo entre CIN1 y alteraciones reactivas y entre CIN2 y CIN3 ^{72,73}.

A pesar de que se considera que el LSIL citológico corresponde al CIN1 histológico y el HSIL con el CIN2 y 3, diferentes estudios han demostrado que detrás del 5-20% de las citologías de LSIL hay en realidad una lesión de alto grado ⁷⁴.

5. Marcadores moleculares de infección viral con valor diagnóstico y pronóstico

5.1. Genotipado VPH 16/18

No todos los genotipos de VPH han demostrado la misma agresividad.

El VPH 16 se asocia con mayor frecuencia a lesiones de alto grado y cáncer en comparación con otros genotipos virales. Así mismo, el VPH 18 se asocia con mayor frecuencia a lesiones glandulares, difíciles de visualizar y detectar mediante citología o colposcopia^{75,76}.

Así mismo, el seguimiento de mujeres infectadas por VPH-AR ha demostrado notables diferencias en el riesgo de progresión a HSIL/CIN3 en función del tipo de VPH-AR presente al inicio del estudio. Estos dos genotipos, especialmente el 16, han demostrado una mayor capacidad de persistencia y mayor riesgo de progresión. El 10-20% de las mujeres infectadas por el VPH 16 o 18 presentan a los 3 años un HSIL/CIN3. En cambio la progresión a HSIL/CIN3 en las mujeres infectadas por otros VPH-AR está alrededor del 3%^{77,78}. En mujeres de más de 30 años estas diferencias pueden ser todavía más notorias.

En el 2009, la FDA aprobó el genotipado para VPH 16/18, recomendando su utilización en mujeres con infección por VPH-AR y citología normal. Las últimas guías clínicas americanas introducen el genotipado VPH 16/18 como parte de selección de las mujeres con infección por VPH y mayor riesgo de lesión cervical⁷⁹⁻⁸¹.

5.2. Sobreexpresión de ARNm de E6/E7

Las pruebas de ARNm detectan la expresión de genes. Los oncogenes virales E6 y E7 sintetizan oncoproteínas que interfieren con proteínas reguladoras del ciclo celular. Esta interacción produce una alteración descontrolada de la célula conduciéndola a la inestabilidad genómica y la transformación maligna.

Actualmente se propone su utilidad, en el marco del cribado del cáncer de cuello de útero, en pacientes con prueba VPH positiva y citología con resultado negativo por el hecho de que el riesgo de lesión subyacente en estas mujeres podría equipararse al de las paciente con citología de LSIL y ASC-US, en las que se ha demostrado que la detección de ARNm de E6 y E7 presenta una sensibilidad similar a la captura de híbridos (83,8% vs. 89,9%), con mejor especificidad (83,8% vs. 58,7%, en mujeres mayores de 30 años) para la detección de lesiones HSIL/CIN2+⁸².

Además, la detección de ARNm de E6 y E7 ha sido postulado como marcador de progresión en mujeres con infección por VPH.

Algunos trabajos sugieren que las pruebas de ARNm de E6 y E7 presentan una relación sensibilidad/especificidad para la detección de HSIL/CIN2+ que permite plantear su utilización como primer escalón de cribado de CCU ⁸³.

5.3. p16 y Ki67. Tinción dual

En condiciones normales, la proliferación celular requiere la inhibición de la pRb. Ésta se consigue mediante su fosforilación, lo que provoca la liberación del factor de transcripción E2F, que hace entrar a la célula en la fase G1 del ciclo celular, aumentando de esta manera la replicación celular. Las proteínas encargadas de fosforilar a la pRb, y por tanto de mantenerla inactivada, son unas quinasas dependientes de ciclina (CDK-4 y 6). La proteína p16, producto del gen CDKN2A localizado en el cromosoma 9q21, es un inhibidor de estas quinasas. Así, en condiciones normales, p16 provoca una hipofosforilación de la pRb y como consecuencia una disminución de la

proliferación celular, por tanto es un marcador subrogado de la interacción de VPH con el ciclo celular (Figura 9).

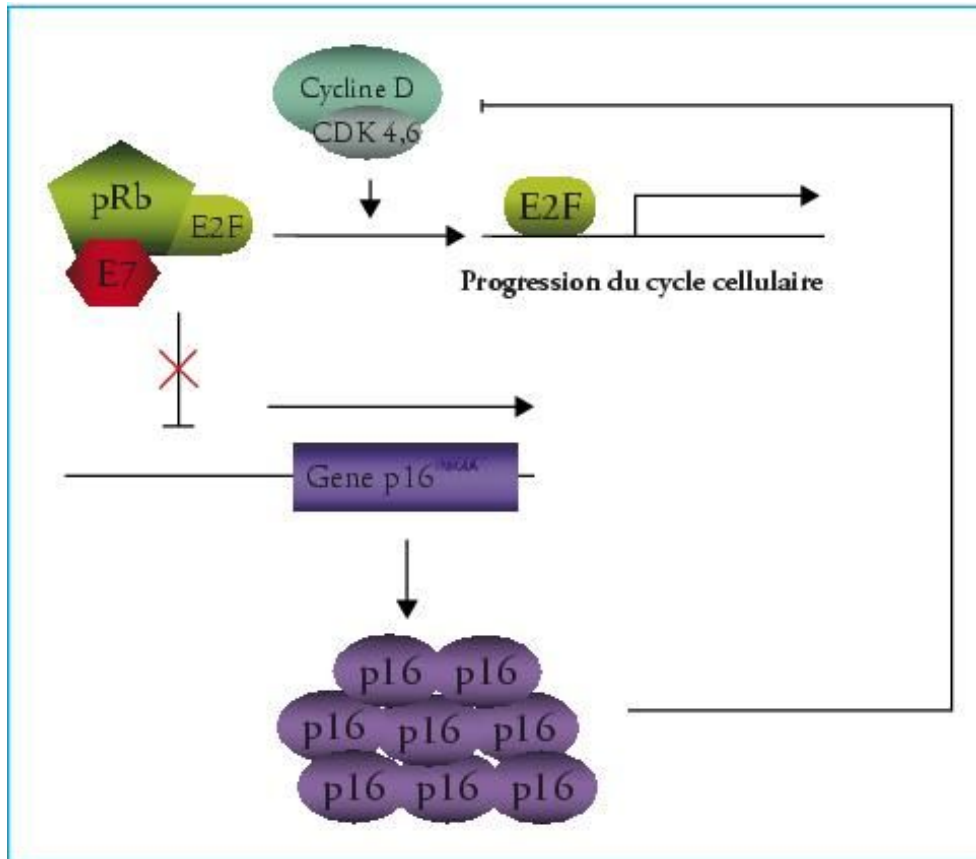


Figura 9. Mecanismo de acción de p16 (Nahet et al. 2016)

La tinción positiva para p16 es marcador de lesión secundaria a la interacción del VPH con el ciclo celular. Casi el 100% de los carcinomas escamosos y de las lesiones de alto grado son positivas para p16, a diferencia de las lesiones metaplásicas o reactivas. La tinción por p16 ha demostrado ser útil en el diagnóstico histológico de lesiones premalignas de difícil detección, aumentando la sensibilidad diagnóstica para estas lesiones y mejorando el acuerdo diagnóstico inter e intraobservador^{84,85}.

Varios trabajos, además, han reportado que aquellas lesiones de bajo grado con una tinción difusa para p16 tienen un riesgo de progresión significativamente mayor que aquellas cuya tinción es negativa⁸⁶. Sin embargo, los resultados presentes en la literatura son controvertidos⁸⁷.

Partiendo de la utilidad de la tinción de p16, se planteó la posible utilidad de la detección simultánea, en una misma célula epitelial cervical, de p16 (tinción marrón citoplasmática) y Ki67 (tinción roja nuclear) (*Figura 10*). En condiciones fisiológicas, la expresión simultánea en una misma célula de una proteína con función supresora tumoral (p16) y de un marcador de proliferación celular (Ki67) sería mutuamente excluyente. Por ello, su co-expresión indicaría la desregulación del ciclo celular en la célula marcada, independientemente de su morfología.

La tinción dual ha ofrecido resultados prometedores en citología. Presenta una mejor especificidad comparada con la detección viral mediante HC2 para la detección de lesiones de alto grado (72,1% vs. 4,4%) y una sensibilidad similar a la citología convencional (90,9% vs. 96,0%)⁸⁸.

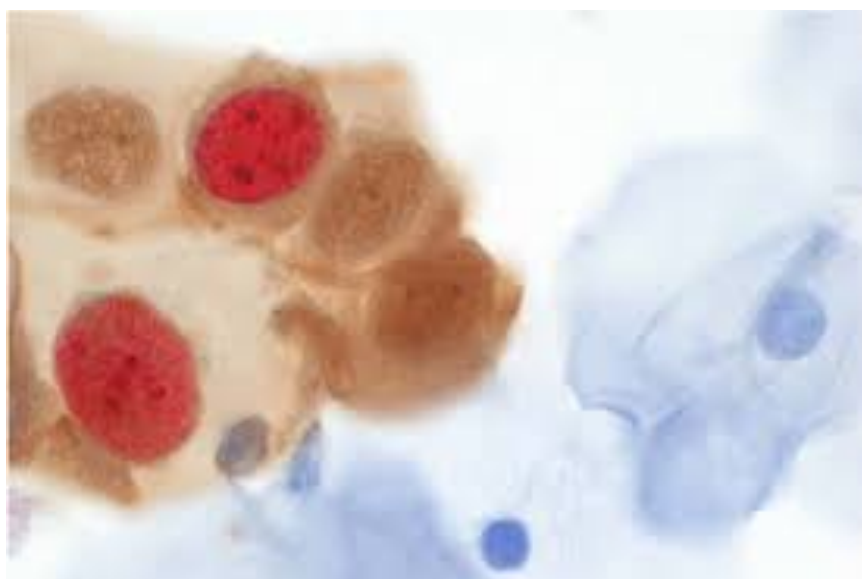


Figura 10. Células epiteliales con tinción dual p16/Ki67

positiva (*Cortesía J.Ordi*)

5.4 ARNm de genes epiteliales asociados a la regulación del ciclo celular

Los resultados de trabajos que evalúan la combinación de diferentes moléculas de ARNm en la selección de mujeres con infección VPH que presentan HSIL/CIN2-3 son prometedores, siendo todavía necesarios estudios multicéntricos que permitan confirmar los resultados preliminares⁸⁹⁻

⁹¹.

5.4.1 Topoisomerasa 2 alfa (TOP2A)

Proteína codificada por el gen TOP2A. Es una enzima nuclear implicada en la condensación de los cromosomas, la separación de cromátidas y la liberación de tensión de la torsión durante la transcripción y replicación del ADN. Se ha observado su sobreexpresión en diversas neoplasias como el CCU, pulmón, colon, área orofaríngea y esófago. Su uso de forma combinada con la proteína 2 del mantenimiento de los microsomas (MCM2) ha mostrado una muy elevada especificidad, unos buenos valores predictivos positivo y negativo para la diferenciación de lesiones del alto grado y metaplasia escamosa, y una buena reproducibilidad, sugiriendo un posible uso diagnóstico en la selección de pacientes con alteraciones citológicas de ASC-US y LSIL⁹².

5.4.2 Survivina (BIRC5)

Es una proteína codificada por el gen BIRC5. Miembro de la familia de

proteínas inhibidoras de la apoptosis, es una proteína cuya expresión es inversamente proporcional a la diferenciación celular: no se expresa en el epitelio normal maduro, mientras que se encuentra sobreexpresada en la mayoría de tumores, incluido el CCU⁹³. En él y en sus lesiones precursoras, se observa una relación lineal entre la severidad de la lesión y la sobreexpresión de la survivina, que es además un factor predictor independiente de infección por VPH⁸⁹.

5.4.3 Metaloproteínasa 9 (MMP9)

Es una proteína de la familia de las zinc-metaloproteínas que participan en la degradación de la matriz extracelular contribuyendo al remodelado de la matriz y contribuyendo a la angiogénesis. Se ha demostrado su implicación en diversas líneas celulares neoplásicas tanto ginecológicas como de otros órganos. En el cuello de útero se ha observado un incremento de la expresión de MMP9 paralelamente al grado de severidad de lesión cervical⁹².

5.4.4 Proteína 5 del mantenimiento de los microsomas (MCM5)

Es una proteína codificada por el gen MCM5 que participa en la replicación del ADN. En células en diferenciación y quiescencia se observa una disminución de la regulación de estas proteínas, por lo que pueden ser útiles como marcadores específicos de células proliferantes. En el cuello de útero, se expresan con normalidad en células basales del epitelio escamoso, y sólo en condiciones de displasia se expresan en la mayoría de células de la superficie epitelial. Sin embargo, parece que su sobreexpresión es

independiente de la infección por VPH, por lo que se considera un biomarcador de displasia cervical independiente de la actividad viral⁹⁰.

5.5 Hipermetilación de promotores genómicos

Uno de los procesos esenciales en la carcinogénesis es la desregulación de la expresión génica. La metilación de promotores genómicos es un mecanismo epigenético, no mutagénico y reversible, fundamental en el control de la expresión de genes implicados en el crecimiento, la diferenciación y muerte celular. La ausencia de metilación del ADN en un promotor genómico permite la plena expresión del gen, mientras que su metilación se correlaciona con su inactivación⁹⁴.

En condiciones normales la mayoría de los promotores controlados por metilación están desmetilados. En cambio, en muchos tumores malignos se observa una hipermetilación en los nucleótidos de estos promotores, lo cual se asocia a una represión de la transcripción de los genes que están bajo su control. La metilación del promotor es uno de los mecanismos más importantes de pérdida de función de determinados genes supresores de tumores y es una de las alteraciones epigenéticas más precoces en la transformación oncogénica, por lo que también puede constituir un marcador temprano de transformación maligna.

En el cuello de útero se han descrito alteraciones de determinados patrones de metilación en genes implicados en el control del ciclo celular y se ha sugerido que estos podrían tener un papel en la transformación maligna de la célula cervical.

Entre todos los genes estudiados, CADM1 y MAL ha mostrado los

resultados más interesantes, puesto que sus promotores parecen estar metilados en las mujeres VPH-positivas con lesiones de alto grado.

El gen CADM1 codifica para una molécula de adhesión celular cuya expresión se ha visto alterada en estadios relativamente avanzados de la transformación celular. MAL, un gen supresor de tumores asociados a la maduración de linfocitos T, es uno de los genes metilados más precozmente en las líneas celulares epiteliales inmortalizados por el VPH.

Por tanto, el estudio de estos dos genes, cuya inactivación parece ocurrir en diferentes estadios de la transformación celular, es de alto interés. De hecho, estudios recientes describen como la proporción de casos con metilación de CADM1 y MAL en la CIN aumenta de forma proporcional al grado de la lesión, sugiriendo que su determinación podría tener valor como marcador de riesgo de progresión⁹⁵. Otros trabajos han evaluado el valor de la metilación de otros genes epiteliales (EPB41L3, FAM19A4, PAX1, SOX1...) así como de microRNAs o de genes virales (L1, L2) en el diagnóstico de HSIL/CIN2-3. A pesar de la heterogeneidad en los métodos utilizados en los diversos, así como en los resultados obtenidos, la metilación de promotores apunta como una alternativa en el cribado molecular de las mujeres con infección por VPH⁹⁶.

6. Manejo de las lesiones precursoras del cáncer de cuello de útero

El objetivo final del tratamiento de las lesiones premalignas del cuello de útero es la eliminación de la neoplasia intraepitelial para evitar su progresión a carcinoma invasor utilizando para ellos los procedimientos más conservadores con menos secuelas y menos consecuencias reproductivas.

En los últimos años, gracias a los avances en el conocimiento de la historia natural de la enfermedad, se ha pasado del tratamiento sistemático del HSIL/CIN2-3 a tener opción de observación sin tratamiento dado el elevado potencial de regresión en algunas situaciones, cuya monitorización estricta permite evitar tratamientos innecesarios.

El principal objetivo de realizar una colposcopia diagnóstica en las pacientes con pruebas de cribado anormales es confirmar o descartar la existencia de una lesión histológica. Actualmente, la conducta ante un resultado histológico anormal dependerá no sólo del grado y características histológicas sino también de otros factores como la edad, el resultado de la citología previa y el tiempo de evolución.

A continuación se recogen las últimas recomendaciones de las guías europeas (EFC), estadounidense (ASCCP) y españolas (AEPCC) sobre el manejo clínico e indicaciones de tratamiento en mujeres de más de 25 años que es la edad recomendada para el inicio del cribado^{79,80,97}.

6.1. Manejo de las lesiones de bajo grado (LSIL/CIN1)

El objetivo del manejo en este grupo de pacientes es prevenir la posible progresión de la lesión, evitando la morbilidad asociada al sobretratamiento. Las lesiones histológicas de LSIL/CIN1 se relacionan tanto con VPH-AR como con VPH de bajo riesgo (VPH-BR).

6.1.1. LSIL/CIN1 precedido de citología de bajo grado

La historia natural de las pacientes con biopsia de LSIL/CIN1 precedido de ASC-US, LSIL o VPH persistente es similar a las que presentan

citología de LSIL en ausencia de lesión histológica o citología de ASC-US con prueba VPH positiva.

Estas mujeres presentan un riesgo de HSIL/CIN2-3 subyacente o de desarrollarlo en los 6-24 meses posteriores de entre un 4-13%, tanto si la biopsia confirma LSIL/CIN1 como si es negativa, y no se han descrito lesiones invasoras en esta población. Concretamente, estas pacientes presentan un riesgo acumulado a los 5 años de HSIL/CIN3 del 3,8%.

En el seguimiento de estas pacientes, la realización de co-test ha demostrado ser superior a la citología o prueba VPH sola. El riesgo de HSIL/CIN2+ a los 5 años de un co-test negativo es del 1,1%, inferior al riesgo tras 5 años de una citología negativa (4%) o de una prueba VPH negativa (1,8%).

Es por ello que se recomienda, de forma preferente, realizar co-test a los 12 meses, aunque también está aceptado realizar colposcopia y citología a los 12 meses.

6.1.2. LSIL/CIN1 precedido de citología de alto grado

En el grupo de mujeres con biopsia de LSIL/CIN1 precedido de citología de ASC-H (del inglés *ASC-cannot exclude high-grade intraepithelial lesion*), HSIL o AGC (del inglés *atypical glandular cells*), el riesgo de diagnosticar un HSIL/CIN3 en los 5 años posteriores es del 15%. Sin embargo, si la colposcopia previa a la biopsia de LSIL/CIN1 es adecuada y la toma endocervical es negativa, se puede realizar seguimiento sin tratamiento durante un máximo de dos años.

Realizar un tratamiento escisional es una opción recomendada si la

colposcopia no es adecuada o si la toma endocervical presenta alguna alteración o no es valorable. Este procedimiento se fundamenta en el riesgo de infradetección de la lesión en la colposcopia y biopsias previas. Sin embargo, la posible morbilidad asociada al tratamiento hace que se tenga que valorar el balance de riesgo-beneficio de esta estrategia.

Se recomienda de forma preferente realizar co-test anual durante dos años y si durante este tiempo persisten las citologías de HSIL o ASC-H es recomendable realizar tratamiento escisional.

6.1.3. LSIL/CIN1 endocervical

El riesgo de HSIL/CIN2+ en pacientes con LSIL/CIN1 endocervical, que presenta una alta tasa de regresión espontánea, es equiparable al de pacientes con una lesión de LSIL/CIN1 exocervical. Además, las muestras endocervicales pueden ser positivas por contaminación por la presencia de una lesión exocervical.

Se recomienda realizar co-test con estudio endocervical a los 12 meses si la citología previa es de LSIL o ASC-US. Sin embargo, en caso de citología previa de HSIL, ASC-H o AGC está indicado el tratamiento escisional dado que la posibilidad de infradiagnóstico de una lesión HSIL/CIN2+ endocervical es elevada.

6.2. Manejo de las lesiones de alto grado (HSIL/CIN2-3)

Clásicamente, las lesiones de alto grado se consideraban, de forma conjunta, lesiones con un riesgo de progresión a lesión invasora elevado, por lo que se indicaba tratamiento sistemático de todas ellas.

En general, las paciente con HSIL/CIN3 que no reciben tratamiento presentan un riesgo de progresión a cáncer a corto plazo del 30% y a largo plazo del 50%. La tasa de progresión a carcinoma invasor de las lesiones de HSIL/CIN2 es del 22%.

Estudios recientes muestran que hasta el 40-74% de las pacientes con diagnóstico histológico de HSIL/CIN2 pueden regresar espontáneamente en los 2 años siguientes al diagnóstico. Los factores más frecuentemente asociados a la regresión son la edad inferior a los 25 años, las lesiones poco extensas y la negativización del VPH.

Actualmente se recomienda el tratamiento de todas las pacientes con HSIL/CIN2-3, ya que globalmente presentan un mayor riesgo de persistencia o progresión que de regresión y existe evidencia de que el tratamiento de dichas lesiones reduce la incidencia y mortalidad por CCU. Sin embargo, en situaciones especiales está aceptada la observación sin tratamiento por la elevada tasa de regresión.

6.2.1. HSIL/CIN2-3 y lesión pequeña sin afectación endocervical

En caso de lesiones que ocupan menos de un cuadrante, la escisión de la lesión o la regresión asociada a la biopsia justifican la desaparición de la lesión en hasta el 20% de los casos. En fenómeno explica, en parte que entre el 15-20% de las conizaciones realizadas tras una biopsia de HSIL/CIN2-3 no hallen lesión en la pieza histológica.

6.2.2. HSIL/CIN2 en mujeres menores de 30 años

En estos casos está aceptada la observación sin tratamiento durante

un periodo máximo de dos años, ya que se ha evidenciado una tasa de regresión no despreciable en pacientes con diagnóstico histológico de HSIL/CIN2 que presentan menor edad, lesiones poco extensas y sin afectación endocervical.

La negativización de la prueba VPH-AR en el seguimiento se asocia a mayor probabilidad de regresión de la lesión. La persistencia del VPH (especialmente del VPH 16) se asocia a una mayor frecuencia de persistencia o progresión.

Se recomienda realizar conización en aquellos casos de HSIL/CIN2 que presentan progresión durante el seguimiento (aumento del tamaño lesional o biopsia de HSIL/CIN3) o persistencia de la lesión a los 24 meses.

6.2.3. HSIL/CIN2-3 en gestantes

El tratamiento de HSIL/CIN2-3 durante la gestación se asocia a una elevada tasa de complicaciones.

La tasa de progresión a carcinoma invasor a corto plazo es excepcional y no justifica tratar sistemáticamente a todas las gestantes. Aproximadamente el 20-30% de los casos pueden regresar durante la gestación.

Se recomienda realizar seguimiento con citología y colposcopia en intervalos no inferiores a 12 semanas. Repetir biopsia únicamente en aquellos casos en los que la citología sugiera cáncer o se agraven las características lesiones en la valoración colposcópica. La práctica de una procedimiento escisional se debe limitar a aquellos casos con signos de sospecha clínico-colposcópica o histológica de invasión.

6.3. Manejo de adenocarcinoma *in situ* (AIS)

Los cambios colposcópicos asociados al adenocarcinoma *in situ* (AIS) pueden ser mínimos por lo que determinar la extensión de la lesión mediante colposcopia es difícil. Además, el AIS con frecuencia se extiende cranealmente en el canal endocervical, es multifocal o afecta en profundidad las glándulas endocervicales. Por ello, la escisión completa es difícil. Incluso ante una conización con márgenes negativos, no es posible asegurar que la escisión de la lesión ha sido completa. El diagnóstico de AIS por biopsia, bien sea dirigida por colposcopia o por legrado endocervical, es provisional. El diagnóstico definitivo debe hacerse en la pieza de conización. Es importante que la conización se realice obteniendo una sola pieza quirúrgica no fragmentada y que permita la valoración de los márgenes quirúrgicos. Por ello, ante la sospecha citológica o la biopsia dirigida de AIS, debe realizarse una conización cervical tipo 3 (en 'sombrero de copa').

La histerectomía es el tratamiento de elección en las pacientes con AIS que hayan cumplido su deseo genésico. En casos de deseo gestacional está aceptado el seguimiento estricto, siempre y cuando la pieza de conización descarte lesión invasora y, una vez cubierto el deseo genésico, se debe valorar de forma individual realizar una histerectomía.

La tasa de recidiva tras conización conlleva un riesgo alrededor de 10% de persistencia del AIS aun cuando los márgenes de la pieza quirúrgica son valorables y negativos.

Las pacientes con márgenes y/o legrado o citología por cepillado

endocervical positivos, y/o presencia de sospecha histológica de invasión tienen un riesgo muy elevado de adenocarcinoma invasivo.

En el seguimiento a largo plazo de pacientes tratadas de forma conservadora por AIS, la prueba VPH-AR es el factor predictivo más importante de recurrencia. Las mujeres con una VPH post-tratamiento negativo presentan un riesgo muy bajo de AIS persistente o recurrente.

7. Vacunas frente al VPH

La vacunación sistémica frente al VPH se considera actualmente la intervención más eficaz y efectiva para el control de la infección y la prevención de la carga de enfermedad asociada al VPH.

Las vacunas están constituidas por partículas no infecciosas similares al virus denominadas VLPs (*viral like particles*), producidas mediante el auto-ensamblaje de las proteínas L1. Las VLPs se obtienen mediante técnicas de recombinación genética de la cápside de los diferentes genotipos de VPH⁹⁸.

Actualmente se dispone de tres vacunas frente al VPH: la bivalente, la tetravalente y la nonavalente. La vacuna bivalente está constituida por VLPs de los genotipos 16 y 18. La tetravalente contienen además VLPs de los genotipos 6 y 11. La última vacuna desarrollada es la nonavalente, que incluye VLPs de los 4 genotipos incluidos en la tetravalente (6, 11, 16 y 18), así como VLPs de los genotipos 31, 33, 45, 52 y 58, responsables de un 20% adicional de casos de CCU, alcanzando un potencial preventivo total para dicha neoplasia de un 90%^{76,99}.

Las vacunas frente al VPH previenen la infección de los virus que contiene, es decir, tienen eficacia profiláctica, pero no modifican la historia

natural de las infecciones en curso por los tipos de VPH incluidos en las vacunas, por lo que el potencial preventivo es mayor cuando se aplican a personas no expuestas. Además, se ha demostrado una significativa protección cruzada frente a los genotipos 31, 33 y 45 con la vacuna bivalente y de forma independiente sólo para el genotipo 31 con la vacuna tetravalente (*Figura 11*).

Los resultados de los ensayos clínicos de fase II y III realizados con las vacunas bivalentes y tetravalentes demuestran la elevada seguridad, inmunogenicidad y eficacia en la prevención de las infecciones por VPH y lesiones precancerosas cervicales asociadas, especialmente si se administran en adolescentes, antes de sus primeras relaciones sexuales, y por tanto, antes de la primera exposición al virus^{98,100}. Los ensayos clínicos con la vacuna nonavalente también muestran una elevada seguridad, inmunogenicidad y eficacia en la prevención de la infección y las neoplasias cervicales relacionadas con los genotipos incluidos en la vacuna, y sugieren que la vacuna tiene un alto potencial para reducir de forma importante la carga de enfermedad asociada al VPH¹⁰¹.

Múltiples y extensos estudios de las vacunas post-comercialización, en países que han implementado programas de vacunación sistémica con elevada cobertura, sugieren una efectividad muy alta a nivel poblacional, con reducciones superiores al 80% en la prevalencia de infección por genotipos incluidos en las vacunas, así como en la incidencia de verrugas genitales y lesiones cervicales de alto grado¹⁰⁰.

	Cervarix © (23) - GSK	Gardasil © (24) - Merck/SPMSD	Gardasil 9 ©(25) - Merck/SPMSD
Tipos de VLP	16/18	6/11/16/18	6/11/16/18/ 31/33/45/52/58
Contenido	20/20 mcg	20/40/40/20 mcg	30/40/60/40 mcg 20/20/20/20/20 mcg
Adyuvante	AS04 (hidróxido de aluminio, MPL)	Hidroxifosfato sulfato de aluminio (AAHS)*	Hidroxifosfato sulfato de aluminio (AAHS)**
Pautas***	0, 6 meses (9-14 años) 0, 1, 6 meses (≥ 15 años)	0, 6 meses (9-13 años) 0, 2, 6 meses (≥ 14 años)	0, 6 meses (9-14 años) 0, 2, 6 meses (≥ 15 años)
Indicaciones	Lesiones precancerosas cervicales, vulvares, vaginales y anales, y cáncer de cérvix y ano	Lesiones precancerosas cervicales, vulvares, vaginales y anales, y cáncer de cérvix y ano; verrugas genitales	Lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino, vulva, vagina y ano; verrugas genitales
<p>MPL: monofosforil lípido A; VLP: virus-like particles * 225 mcg ** 500 mcg *** En situaciones de inmunodepresión, la pauta será siempre de tres dosis</p>			

Figura 11. Características de las vacunas profilácticas frente al VPH.
(AEPCC – Guía vacunación 2016)

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las técnicas de detección del virus del papiloma humano (VPH) han demostrado una mejor sensibilidad respecto a la citología (prueba de Papanicolaou) en la detección de las lesiones premalignas de cuello de útero. Por el contrario, la menor especificidad de la prueba VPH condiciona el seguimiento y evaluación de muchas mujeres que no son portadoras de infecciones o lesiones con riesgo de progresión a cáncer de cuello de útero (CCU). El estudio sistemático mediante colposcopia de todas las mujeres con prueba VPH positiva supone un problema asistencial y de costes importante.

Por tanto, los dos principales problemas que afrontan los programas de cribado del CCU son: 1) elegir una prueba VPH que demuestre tener el mejor perfil de sensibilidad y especificidad y 2) identificar biomarcadores moleculares que sean útiles en la selección de mujeres con prueba VPH positiva y riesgo de desarrollar lesiones cervicales con capacidad de progresión.

Estudios previos señalan como potenciales biomarcadores de riesgo de lesión de alto grado o CCU (HSIL/CIN2+) el genotipado para VPH 16/18 y/o la citología con tinción dual p16/Ki67. Estos biomarcadores se han propuesto en las Guías Clínicas de Cribado para la selección de mujeres con prueba VPH positiva y citología negativa para identificar al subgrupo de mujeres con mayor riesgo de lesión cervical subyacente. Sin embargo, queda menos claro el valor pronóstico del genotipado y de la tinción dual p16/Ki67 en la evaluación mujeres con infección VPH y sin lesión cervical.

Sobre estas premisas, la presente tesis se plantea de acuerdo con las siguientes hipótesis:

1. Los test moleculares de detección y genotipado de VPH, Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2, presentan una buena sensibilidad clínica y especificidad, por lo que podrían ser útiles como prueba de cribado en el cáncer de cuello de útero.
2. Los biomarcadores asociados al VPH (genotipado, y tinción dual p16/ki67) en mujeres con infección VPH y citología normal tienen valor pronóstico y permiten identificar a las pacientes con mayor riesgo de desarrollar HSIL/CIN2+.

III. OBJETIVOS

1. Evaluar la concordancia de las pruebas de detección del VPH (HC2, Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) en el diagnóstico de la infección viral **(Estudio 1)**.
2. Analizar el grado de concordancia en la detección de tipos de VPH entre las pruebas que informan sobre el genotipado (Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) **(Estudio 1)**.
3. Evaluar y comparar la sensibilidad clínica y la especificidad para el diagnóstico de HSIL/CIN2+ entre las diferentes pruebas de detección VPH (Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) **(Estudio 1)**.
4. Evaluar y comparar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de HSIL/CIN2+ en los casos con determinación positiva para VPH 16/18 según la prueba Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2 **(Estudio 1)**.
5. Estudiar si el genotipado para VPH 16/18 puede constituir un marcador pronóstico en mujeres con prueba VPH positiva y ausencia de lesión o LSIL/CIN1 (progresión a HSIL/CIN2+, persistencia y/o regresión de la infección por VPH) **(Estudio 2)**.
6. Estudiar si la citología con tinción dual p16/Ki67 puede constituir un marcador pronóstico en mujeres con prueba VPH positiva y ausencia de lesión o LSIL/CIN1 (progresión a HSIL/CIN2+, persistencia y/o

regresión de la infección por VPH) (**Estudio 2**).

***IV. INVESTIGACIONES
REALIZADAS. METODOLOGÍA Y
RESULTADOS***

El diseño del estudio, la población de estudio, así como la metodología utilizada se detallan en los apartados de 'Material y Métodos' de cada uno de los artículos que constituyen el cuerpo doctrinal de la presente tesis doctoral.

Dichos artículos se incluyen a continuación tal y como han sido aceptados para publicación en la literatura científica.

Estudio 1

“Comparison of the Analytical and Clinical Performance of Five Tests for the Detection of Human Papillomavirus Genital Infection”

Marta DEL PINO, Inmaculada ALONSO, Adriano RODRÍGUEZ-
TRUJILLO, Sílvia BERNAL, Dan GERAETS, Núria GUIMERÀ,
Aureli TORNÉ, Jaume ORDI

Journal of Virological Methods 248 (2017) 238–243

**Comparison of the Analytical and Clinical Performance of Five Tests for
the Detection of Human Papillomavirus Genital Infection**

M. del Pino¹, I. Alonso¹, A Rodríguez-Trujillo¹, S. Bernal², D Geraets³, N

Guimerà³, A Torne¹, J Ordi²

¹ Institut Clinic of Gynecology, Obstetrics and Neonatology, Hospital Clínic-
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty
of Medicine-University of Barcelona, Barcelona, Spain; ² Department of
Pathology, ISGlobal (Instituto de Salud Global) Hospital Clínic, University of
Barcelona Faculty of Medicine, Barcelona, Spain; ³ DDL Diagnostic
Laboratory, Rijswijk, The Netherlands

Corresponding author: Jaume Ordi, Department of Pathology, ISGlobal
(Instituto de Salud Global) Hospital Clínic, University of Barcelona Faculty of
Medicine, Barcelona, Spain, Villarroel 170, 08036. Tel. +34 93 227 247. 2
FAX: +34 93 227 54 54 Barcelona, Spain; e-mail address: jordi@clinic.ub.es

Keywords: human papillomavirus (HPV) DNA, HPV genotyping, high grade
squamous intraepithelial lesion, HSIL, Anyplex, CLART2, GP5+/6+, Linear
Array

Abstract

HPV-based screening provides greater protection against cervical cancer (CC) than cytology-based strategies. Currently, several molecular diagnostic assays for the detection of human papillomavirus (HPV) are available. In this study, we analyzed 5 different HPV testing and genotyping techniques (Hybrid Capture 2 [HC2; Qiagen, Hilden, Germany], AnyplexTMII HPV28 [Anyplex; Seegene, Seoul, Korea], Linear Array [Roche, Branchburg, NJ, USA], GP5+/6+ PCR-EIA-RH [Labo Bio-medical Products, Rijswijk, The Netherlands] and CLART2 [Genomica, Madrid, Spain]) in 295 women referred to the hospital Colposcopy Clinic from 2007 to 2008 due to positive HPV test results or an abnormal Pap test. DNA extraction for HPV genotyping was performed in cervical sample specimens after Pap test and HPV detection by HC2. The inclusion criteria were: (1) adequate cervical sampling with sufficient material for the Pap test and HPV detection and genotyping, and (2) colposcopically-directed biopsy and/or endocervical curettage. HC2 showed the highest sensitivity for high-grade squamous intraepithelial lesion and CC (HSIL+) detection (96.1%), but all the HPV genotyping tests showed a higher specificity. (Anyplex 86.8%; Linear Array 86.0%; GP5+/6+ 78.8%; CLART2 76.5%). The agreement between HC2 results and the other techniques was similar: (82.4%, kappa = 0.650 for Anyplex; 83.4%, kappa = 0.670 for Linear Array, 79.93%, kappa = 0.609 for GP5+/6+ and 82.4%, kappa=0.654 for CLART2. HPV 16 and/or 18 infection was a risk factor for underlying HSIL+ in the univariate analysis. Anyplex showed the highest risk of underlying HSIL+ after positive HPV 16 and/or 18 tests (OR 31.1; 95% IC 12.1-80.0).

INTRODUCTION

High-risk human papillomaviruses (hr-HPV) are the causative agents of cervical cancer (CC) and its precursors. (1;2) A consequence of this well-established causal link between hr-HPV infection and CC development (3) is the introduction of hr-HPV DNA testing in CC screening programs, initially implemented as a complement to the Pap test and, in the last few years, as the first line screening test. (4;5) hr-HPV DNA testing has shown a higher sensitivity than cytology in detecting high-grade squamous intraepithelial lesions or CC (HSIL+) (6-8), and there is evidence that HPV-based screening provides better protection against CC than Pap test-based strategies. (9) hr-HPV DNA testing is also the recommended method in the follow-up of patients treated for HSIL+, since it is more accurate than repeated cytology in diagnosing residual disease or relapse. (10;11)

Currently, several molecular diagnostic assays for the detection of HPV are available. Hybrid Capture 2 (HC2, Qiagen, Hilden, Germany) was the first technique approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and has become the reference test against which the newly developed HPV assays have to be assessed. (12) The Cervista HPV HR Test (Hologic, Madison, WI, USA) (13), and the Roche Cobas 4800 HPV Test (Roche, Branchburg, NJ, USA) have also received FDA approval for the detection of hr-HPV in CC screening (14;15), and the Abbott RealTime High-Risk HPV test (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) has obtained CE Marking. (16) All these tests, designed for screening, simultaneously detect different hr-HPV genotypes and do not allow specific typing, although some (Roche Cobas 4800 HPV Test, Abbott RealTime High-Risk HPV) provide specific genotyping

information for HPV 16 and 18, which are considered the HPV types with the highest carcinogenic risk. (17-20)

A number of commercially available techniques allow specific genotype identification: INNO-LiPA HPV Genotyping Extra kit (Innogenetics, Ghent, Belgium), CLART2 (Genomica, Madrid, Spain), Linear Array assay (Roche, Branchburg, NJ, USA), GP5+/6+ PCR-EIA-RH (GP5+/6+, Labo Bio-medical Products, Rijswijk, The Netherlands), Anyplex TMII HPV28 (Anyplex, Seegene, Seoul, Korea). These techniques have been approved within the European Union (CE Marking) and have shown to be useful in epidemiological studies to improve the triage of HPV-positive women by single type risk stratification, (20;21) and the follow-up of persistent infection. (18;21)

The aim of the present study was to compare the analytical and clinical performance of Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ and the CLART2 assay with HC2, which is the reference test routinely used in many laboratories for HPV detection in women referred to colposcopy.

MATERIAL AND METHODS

Study design and patient selection

This transversal study was performed at the Hospital Clinic of Barcelona, Spain. Data from all women referred to the hospital from 2007 to 2008 due to a positive hr-HPV test result or a Pap test result of atypical squamous cells, atypical glandular cells, low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), HSIL, or CC within the 6 months previous to admission were reviewed.

From all women referred in this period we selected women who fulfilled the following inclusion criteria: (1) adequate cervical sampling with sufficient material for cytology (Pap test) and all the HPV tests (HC2, Anyplex, CLART2, Linear Array assay, and GP5+/6+); and (2) adequate colposcopy examination with at least a colposcopically-directed biopsy and/or endocervical curettage. A total of 295 women met the inclusion criteria and were therefore included in the study.

The study was approved by the institutional Ethical Review Board of the Hospital Clinic. All patients provided written consent for the use of biological specimens for research purposes after the clinical procedures were completed.

Patient Management

Prior to the colposcopy procedure, a cervical sample was collected from all the women using a cytobrush, which was transferred to PreservCyt solution (Hologic, Marlborough, MA, USA). The first part of the sample was used for ThinPrep liquid-based cytology. The residual material was used first for hr-HPV testing by HC2 and second to test the different assays for HPV detection and genotyping.

Colposcopy was performed using an Olympus Evis Exera II CV-180 colposcope (Olympus, Barcelona, Spain) after preparing the cervix with 5% acetic acid. A colposcopically-directed biopsy was taken in all patients on the identification of an abnormal area. (22;23) When the transformation zone was not completely visible, endocervical curettage using a Kervokian curette was also performed. A random biopsy from the transformation zone was

performed in all the women with a completely visible transformation zone having no colposcopic abnormalities. (24;25)

Liquid-based cytology and histological diagnosis

Thin-layer cytology slides were prepared using the Thinprep T2000 slide processor (Hologic) and stained using the Papanicolaou method. Cytology slides were evaluated by a cytotechnologist and confirmed by a pathologist using the revised Bethesda nomenclature. (26) Formalin-fixed, paraffin-embedded 4-mm sections were routinely stained with hematoxylin and eosin (H&E). All the histological samples were reviewed by one of the authors (JO) to confirm the presence or absence of cervical lesion and its grade. The histological diagnoses were established using pure morphologic criteria based on the H&E-stained sections, with no knowledge of HPV status or the cytology result. The LAST nomenclature was used for the histological diagnosis. (27)

Routine HPV detection (hybrid capture II)

Detection of hr-HPV was performed in cytological samples. Initially hr-HPV detection was undertaken with the Hybrid Capture 2 (HC2) system (Qiagen, Hilden, Germany) in the samples collected in liquid-based media (PreservCyt). This test detects the following genotypes: 16, 18, 31, 33, 36, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68. A relative light unit of 1 (1.0 pg/mL) was used as the cut-off to classify a specimen as positive for hr-HPV. (28)

Detection of HPV by genotyping tests

After the initial processing that included the Pap test and HC2 testing the residual material was centrifuged and the pellets stored at -80°C until processing. For all the other genotyping tests DNA extraction was performed using 250µL of the cervical sample specimen to obtain 100 µL of eluate with the QIAamp MinElute Virus Spin kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. DNA yields were quantified spectrophotometrically using the Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). A negative and a positive internal control were used in each genotyping assay according to the manufacturer's procedure. All genotyping assays were tested twice with each sample. A sample was considered invalid for a specific test when both results were invalid.

Anyplex II HPV28 (Anyplex) was performed according to the manufacturer's instructions with using 5 µl DNA in each of the two 20µl reaction mixtures with primer set A or B and a CFX96 real-time thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A-set has 14 hr-HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) and B-set covers five HR and nine LR types (26, 53, 69, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, and 70). Anyplex uses the Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension (TOCE) technology (Seegene, Seoul, Korea) a novel approach that enables the detection of multiple targets in the same fluorescence channel of real-time PCR. The *L1* gene of HPV and human beta-globin was simultaneously co-amplified as an internal control to monitor DNA purification efficiency, PCR inhibition, and cell adequacy. (29) The thermal cycler conditions consisted of an initial incubation at 50°C for 4 minutes, denaturation at 95°C for 15 minutes,

followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 1 minute, and elongation at 72°C for 30 seconds.

Linear Array HPV genotyping test (Linear Array). This assay recognizes the following HPV types: hr-HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68 and lr-HPV types 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 73, 82, 83, 84, and IS39 and CP6108. (30) Amplification, hybridization, and detection steps were performed as recommended by the manufacturer. Briefly, ten µL of extracted DNA was employed in the PCR reaction. PCR was performed in a final reaction volume of 100 µl. The mixture was incubated for 2 minutes at 50°C and for 9 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 95°C for 30 seconds, and elongation at 72°C for 1 minute. *GP5+/6+ PCR-EIA-RH (GP5+/6+).* Ten µL of isolated DNA were amplified by the GP5+/6+ PCR, and hr-HPV was detected by the EIA (Diassay, Rijswijk, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. (31) GP5+/6+ PCR was performed in a total volumen of 50 µl. The mixture underwent 4 minutes denaturation step at 94°C, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 20 seconds, annealing at 40 °C for 2 minutes and a chain elongation step at 72°C for 1 minutes. The first cycle was preceded by a 4 min denaturation at 94 °C and the last cycle was extended by a 4 min elongation at 72 °C. (32) Fourteen hr-HPV types can be targeted with the GP5+/6+ test: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68. After GP5+/6+ PCR, EIA was performed. Three times the mean OD of the PCR negative controls (OD ≤0.120) was used as the cut-off value to classify samples as positive for HPV. This assay does not identify HPV genotypes individually.

Thus, next, the EIA-positive GP5+/6+ amplimers were genotyped by Reverse Hybridization using Line Probe Assay, according to the manufacturer's instructions. Briefly, ten µl of the biotinylated products of PCR were mixed in test troughs and incubated at room temperature for 5 minutes after that, 1ml of the prewarmed (37°C) hybridization solution and one strip was added to each trough. Hybridization was performed for 1hour at 50°C in a closed water bath with back-and-forth shaking. The strips were washed twice with 1ml of wash solution, at room temperature for 20 seconds and once at 50°C for 30 minutes. After the washing step, strips were rinsed twice with 1ml of a standard rinse solution. (33) Strips were incubated on a rotating platform with an alkaline phosphatase-labeled streptavidin conjugate diluted in a standard conjugate solution for 30minutes at 25°C. Strips were then washed twice with 1ml of rinse solution and once with standard substrate buffer, and color development was initiated by addition of 5-bromo-4-chloro- 3-indolyphosphate and nitroblue tetrazolium to 1ml of substrate buffer. (33) After 30minutes of incubation at room temperature, the color reaction was stopped by aspiration of the substrate buffer and addition of distilled water. After drying, the strips were visually interpreted using a grid.

CLART HPV2 Assay (CLART2). This test uses biotinylated MY09/11 consensus primers and is able to detect 35 HPV types, including 20 hr-HPV types (type 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85) and 15 Ir-HPVs (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 89). The test was performed according to the manufacturer's instructions. (34;35) Briefly, five µL of eluted DNA were added to 45 µL of Genomica Master Mix for HPV testing. After an initial denaturation step at 95°C for 5

minutes, reaction mixtures underwent 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds followed by annealing at 55°C for 60 seconds, and elongation step at 72°C for 90 seconds, and finally a cycle of 4°C for 8 minutes. Detection of PCR product was made by a low-density microarray platform, CLART (Clinical Array Technology). Results were automatically analyzed in CLART Human Papillomavirus 2 specific software as well as manually surveyed using the CLART grid (Genomica).

Final Diagnosis

The diagnosis of CC and HSIL was established in all cases after histological confirmation. Diagnosis of LSIL was determined based on either histological confirmation or the LSIL result in the Pap test. Women with a negative biopsy and normal Pap test results were classified as negative for intraepithelial lesion or malignancy.

Data analysis

Data analyses were performed with the SPSS version 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The statistical methods used in the study were mostly descriptive. The Student t-test or analysis of variance was used to compare quantitative variables. Qualitative variables were compared with the Chi square test. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative predictive values (NPV) were determined by comparing the results of the HPV testing assays with the final diagnoses. For these values, 95% confidence intervals (CI) were assessed using either a binomial or normal distribution according to the data. The κ value and its standard deviation (SD) were calculated as a measure of

agreement for positive testing and between the HPV genotypes observed in the different tests.

HPV genotype concordance among the different HPV genotyping tests was analyzed and classified as follows: 1) identical if all genotypes were identified by the different tests; 2) concordant when the analysis showed at least one identical genotype; and 3) different if there were no similarities between the genotypes found.

Univariate logistic regression was performed to identify the risk of a positive HPV test and a positive result for HPV16 and/or 18 for underlying HSIL+, with the odds ratio (OR) reported as an estimate of relative risk.

RESULTS

The mean age of the women included in the study was 37.4 ± 13.1 years (range 15-78). The final diagnosis after the completion of the study was CC in 9 women (3.1%; 6 squamous cell carcinomas, 3 adenocarcinomas), HSIL in 44 women (14.9%), LSIL in 78 women (26.4%), and negative in 164 women (55.6%). Of the 78 women classified as LSIL, 43 (55.1%) had a histological diagnosis, whereas in 35, the diagnosis was established on the basis of LSIL cytology with a negative biopsy.

Table 1 shows the number of valid samples for each assay and the percentage of women with positive HPV results by HC2 and the four HPV genotyping tests according to each final diagnostic category. The agreement between HC2 results and the results obtained with the other techniques (positive vs. negative testing) was similar: 82.4% (95%CI= 77.6-86.4%), kappa = 0.650 ± 0.044 for Anyplex; 83.4% (95% CI= 78.7-87.3%), kappa =

0.670 ± 0.043 for Linear Array, 79.93% (95%CI=75.0-94.1%), kappa = 0.609 ± 0.042 for GP5+/6+ and 82.4% (95%CI 77.1-86.7%), kappa=0.654 ± 0.046 for CLART2.

Table 2 shows the sensitivity, specificity and PPV and NPV for the detection of HSIL+ with all the molecular HPV tests. Among the four genotyping tests Anyplex showed the highest sensitivity for HSIL and CC detection.

Among the positive cases, 42.0% (58 out of 138 positive cases) showed multiple HPV types with Anyplex, 44.0% (62/141) with Linear Array, 20.4% (19/93) with GP5+/6+ and 40.7% (44/108) with the CLART2 test. The differences between the rates of multiple-infected lesions were statistically significant (Supplementary tables 1-6).

The genotype distribution among the Anyplex positive cases identified by each specific test is shown in Table 3. The comparison of the genotype distribution between Anyplex and Linear Array in the 125 cases positive for both techniques showed identical genotypes in 73 (58.4%) samples, concordant genotypes in 47 (37.6%) and different genotypes in 5 (4.0%). Both tests were negative in 133 samples. The comparison between Anyplex and GP5+/6+ in the 86 samples positive for both assays showed identical genotypes in 53 (61.6%), concordant results in 31 (36.1%) and different HPV genotypes in 2 (2.3%). One hundred forty-five samples were negative for both tests. On comparing Anyplex and CLART2, both tests were positive in 103 samples. Identical genotypes were found in 61 (59.2%), concordant

genotypes in 39 samples (37.9%) and different genotypes in 3 (2.9%). Both tests were negative in 106 samples.

Table 4 shows the risk of a positive hr-HPV test for underlying HSIL+ lesion according to the HC2 test and the risk of a positive result for HPV non 16 non 18 and positive result for HPV 16 and/or 18 for underlying HSIL+ lesion according to the different assays. Positive HPV testing, especially positive results for HPV 16 or 18 were associated with the risk of an underlying HSIL+ lesion. Anyplex showed the highest risk of underlying HSIL+ results after a positive result for the HPV 16 or 18 test (OR 31.1; 95% CI 12.1-80.0).

DISCUSSION

The present study compared different HPV tests in a routine diagnostic setting. HC2 showed the highest sensitivity for HSIL+ detection while the sensitivity of Anyplex and Linear Array was 90% of that shown by the HC2 test, (36) and they could therefore be considered candidate tests for CC screening according to the international guidelines for HPV test validation. On the other hand, CLART2 and GP5+/6+ showed a lower sensitivity, although the latter showed the highest specificity. Patients under 30 years of age present a high prevalence of HSIL lesions, (15) most of which regress and are not the objective of CC screening strategies. Thus, the lower sensitivity of CLART2 and GP5+/6+ could be helpful in this specific age group. All the HPV tests showed a higher sensitivity than the cited 51% benchmark of cytology sensitivity as a stand-alone test. (9;37) All HPV genotyping tests showed a higher specificity than HC2 for the detection of HSIL+. The similar clinical

sensitivity and superior or equal specificity of the four HPV genotyping tests compared to HC2, observed in primary screening, is in agreement with the findings from previous studies on its performance in the triage of women with minor cytological abnormalities. (12;29;36;38)

The agreement in terms of positivity/negativity of the different HPV genotyping tests compared with HC2 was about 80% or higher. The high agreement between the tests is in line with previous comparative reports. (38-43) Similarly, genotype concordance was over 80%. Different HPV types were found in less than 5% of the HPV positive samples. Despite the different HPV types included in each test and the differences in terms of sensitivity and specificity, high concordance has been also reported between genotype distribution in previous studies. (38;39;41-44)

In the present study, the rate of multiple HPV infections significantly varied from 20.4% to 44.0% depending on the test used. This is in line with previous studies comparing different methods for HPV typing and describing considerable differences in the multiple infection rates of the individual tests. These series have shown that 15% to 50% of women with prevalent SIL of all grades have multiple hr-HPV genotypes. (45-47) The clinical significance of multiple HPV infections has been analyzed previously. (48;49) However, only limited conclusions can be drawn from HPV typing in cytology, as it includes all infections present on the cervico-vaginal surface including transforming infections related to HSIL lesions, transient infections, and possibly sexually deposited HPV DNA. (46)

In line with the data of the present study, several previous reports have shown an increased risk of underlying or developing HSIL+ after an HPV 16 and/or 18 infection. (18;20;21;50) Indeed, recent guidelines recommend HPV genotyping for HPV 16 and 18 as a triage strategy for women testing positive for HPV. (5;51) Recently, Cuzick et al. reported that the most common hr-HPV detected in women with HSIL histological lesions was HPV16. (52) This is in line with previous reports and with the present study, in which HPV 16 was the HPV type most frequently identified with all the techniques. (18;21)

The main strength of our study is that it includes a series of women studied according to a well-defined protocol routine, which included liquid-based cytology, hr-HPV testing, and colposcopy with directed biopsies, with endocervical curettage being performed in the case of a non visible transformation zone. Thus, the results of HPV testing and genotyping of the cytology sample are directly correlated with a colposcopy and a histological sample. The implementation of highly sensitive analytical HPV assays could detect most underlying high-grade disease, but it can also lead to a large proportion of clinically irrelevant positive results, which would result in unnecessary diagnostic procedures and treatments, increased costs and psychological distress in healthy women. Thus, as previously stressed, clinical sensitivity is more relevant than analytical sensitivity in CC screening, and any new technique should be validated in a clinical setting. Another strength of the present study is that all the genotyping tests were performed in all the women included, thereby avoiding bias in the analysis of clinical performance of the tests studied.

This study has some possible limitations. No follow-up data was available; thus the possible relation between specific type of hr-HPV detected by a test and the risk of developing HSIL+ could not be assessed. It has been suggested that HPV 16 and/or 18 can identify women at higher risk of underlying HSIL+ lesions (51;53) but they are also related to the risk of developing high-grade disease in the follow-up. (18;21) Likewise, HPV 31, 33 or 45 have been related to a higher risk of HSIL+. (18;20;21) However, the current guidelines do not support different follow-up algorithms according to the HPV genotype isolated in a cervical lesion. Another possible limitation is related to the accuracy of colposcopy to guide biopsy sampling, namely when single biopsy from the most worrisome lesion was taken (24) which might miss an underlying HSIL lesion at initial evaluation in a proportion of women. In spite of this possible limitation, colposcopy is currently considered the gold standard to guide biopsy sampling to confirm the diagnosis in these patients. (24)

In conclusion, this study show that most of the HPV tests currently available yield very high concordance and show a similar clinical sensitivity and specificity for HSIL+ detection. (54) Besides accuracy, other assay characteristics should be taken into account when the choice of the screening test is considered. The individual genotyping and the range of targeted genotypes are factors that may play a role in the determination of the preferred HPV assay. Objective tools for quality assurance and monitoring of HPV tests within HPV-based screening programs are warranted.

Funding information

This research was funded in part by Instituto de Salud Carlos III (ICSIII)-Fondo de Investigacion Sanitaria, and ERDF 'One Way to Europe' (PI15/00546).

Reference List

- (1) Bosch FX, de SS. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep* 2002 Mar;4 (2):175-83.
- (2) Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995 Sep 20;87 (18):1365-71.
- (3) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999 Sep;189 (1):12-9.
- (4) Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect* 2015 Sep;21 (9):817-26.
- (5) Torne A, del Pino M, Cusidó M, Alameda F, Andia D, Castellsague XCJ, Granados R, Guarch R, Lloveras B, Lubrano A, Martínez-Escoriza J, Ordi J, Puig-Tintoré LM, Ramírez M, deSanjose S, Torrejón R. Guia de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Progresos de Obstetrícia y Ginecología* 2014;45 (Extraordinario 1):1-53.

- (6) Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006 Sep 1;119 (5):1095-101.
- (7) Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlee F, Franco EL. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007 Oct 18;357 (16):1579-88.
- (8) Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, Radberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 2007 Oct 18;357 (16):1589-97.
- (9) Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014 Feb 8;383 (9916):524-32.
- (10) Barzon L, Giorgi C, Buonaguro FM, Palu G. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. *Infect Agent Cancer* 2008;3:14.
- (11) Torne A, Fuste P, Rodriguez-Carunchio L, Alonso I, del PM, Nonell R, Cardona M, Rodriguez A, Castillo P, Pahisa J, Balasch J, Ramirez J,

- Ordi J. Intraoperative post-conisation human papillomavirus testing for early detection of treatment failure in patients with cervical intraepithelial neoplasia: a pilot study. *BJOG* 2013 Mar;120 (4):392-9.
- (12) Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009 Feb 1;124 (3):516-20.
- (13) Day SP, Hudson A, Mast A, Sander T, Curtis M, Olson S, Chehak L, Quigley N, Ledford J, Yen-Lieberman B, Kohn D, Quigley DI, Olson M. Analytical performance of the Investigational Use Only Cervista HPV HR test as determined by a multi-center study. *J Clin Virol* 2009 Jul;45 Suppl 1:S63-S72.
- (14) Schutzbank TE, Ginocchio CC. Assessment of clinical and analytical performance characteristics of an HPV genotyping test. *Diagn Cytopathol* 2012 Apr;40 (4):367-73.
- (15) Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol* 2015 Feb;136 (2):189-97.
- (16) Carozzi FM, Burroni E, Bisanzi S, Puliti D, Confortini M, Giorgi RP, Sani C, Scalisi A, Chini F. Comparison of clinical performance of

Abbott RealTime High Risk HPV test with that of hybrid capture 2 assay in a screening setting. *J Clin Microbiol* 2011 Apr;49 (4):1446-51.

- (17) Castellsague X, Klaustermeier J, Carrilho C, Albero G, Sacarlal J, Quint W, Kleter B, Lloveras B, Ismail MR, de SS, Bosch FX, Alonso P, Menendez C. Vaccine-related HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention. *Int J Cancer* 2008 Apr 15;122 (8):1901-4.
- (18) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. 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 Jul 20;97 (14):1072-9.
- (19) Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 Oct;8 (10):1139-62.
- (20) Smelov V, Elfstrom KM, Johansson AL, Eklund C, Naucler P, rnheim-Dahlstrom L, Dillner J. Long-term HPV type-specific risks of high-grade cervical intraepithelial lesions: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer* 2015 Mar 1;136 (5):1171-80.
- (21) Thomsen LT, Frederiksen K, Munk C, Junge J, Iftner T, Kjaer SK. Long-term risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse according to high-risk human papillomavirus genotype and semi-

- quantitative viral load among 33,288 women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2015 Jul 1;137 (1):193-203.
- (22) Bornstein J, Sideri M, Tatti S, Walker P, Prendiville W, Haefner HK. 2011 terminology of the vulva of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *J Low Genit Tract Dis* 2012 Jul;16 (3):290-5.
- (23) del Pino M, Torne A, Alonso I, Mula R, Masoller N, Fuste V, Ordi J. Colposcopy prediction of progression in human papillomavirus infections with minor cervical lesions. *Obstet Gynecol* 2010 Dec;116 (6):1324-31.
- (24) van der Marel J, van BR, Rodriguez A, Quint WG, van de Sandt MM, Berkhof J, Schiffman M, Torne A, Ordi J, Jenkins D, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Ter HB, Wentzensen N, del PM. The increased detection of cervical intraepithelial neoplasia when using a second biopsy at colposcopy. *Gynecol Oncol* 2014 Nov;135 (2):201-7.
- (25) van der Marel J, Rodriguez A, del PM, van BR, Jenkins D, van de Sandt MM, Torne A, Ordi J, Ter HB, Verheijen RH, Schiffman M, Gage JC, Quint WG, Wentzensen N. The Value of Endocervical Curettage in Addition to Biopsies in Women Referred to Colposcopy. *J Low Genit Tract Dis* 2015 Jun 16.
- (26) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. The 2001

Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology.
JAMA 2002 Apr 24;287 (16):2114-9.

- (27) Darragh TM, Colgan TJ, Thomas CJ, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol* 2013 Jan;32 (1):76-115.
- (28) Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J Med Virol* 2001 Sep;65 (1):155-62.
- (29) Kwon MJ, Roh KH, Park H, Woo HY. Comparison of the Anyplex II HPV28 assay with the Hybrid Capture 2 assay for the detection of HPV infection. *J Clin Virol* 2014 Apr;59 (4):246-9.
- (30) van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test 1. *J Clin Microbiol* 2006 Sep;44 (9):3122-9.
- (31) Geraets DT, Heideman DA, de Koning MN, Snijders PJ, van A, Meijer CJ, van Doorn LJ, Quint WG. High-throughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV Genotyping LQ Test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J Clin Virol* 2009 Nov;46 Suppl 3:S21-S26.

- (32) de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR
13. J Gen Virol 1995 Apr;76 (Pt 4):1057-62.
- (33) Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter SJ, Lindeman J, Ter HB, Burger M, Quint W. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus
1. J Clin Microbiol 1999 Aug;37 (8):2508-17.
- (34) Sias C, Garbuglia AR, Piselli P, Cimaglia C, Lapa D, Del NF, Baiocchini A, Capobianchi MR. Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV with Genomica HPV Clinical Array for the detection of human papillomavirus DNA. APMIS 2013 Nov;121 (11):1054-63.
- (35) Fagan EJ, Moore C, Jenkins C, Rossouw A, Cubie HA, James VL. External quality assessment for molecular detection of human papillomaviruses
1. J Clin Virol 2010 Aug;48 (4):251-4.
- (36) Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, Snijders PJ. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. J Clin Virol 2009 Nov;46 Suppl 3:S1-S4.

- (37) Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 2000 May 16;132 (10):810-9.
- (38) Ejegod DM, Rebolj M, Bonde J. Comparison of analytical and clinical performance of CLART HPV2 genotyping assay to Linear Array and Hybrid Capture 2: a split-sample study. *BMC Cancer* 2015;15:216.
- (39) Chranioti A, Spathis A, Aga E, Meristoudis C, Pappas A, Panayiotides I, Karakitsos P. Comparison of two commercially available methods for HPV genotyping: CLART HPV2 and Linear Array HPV Genotyping tests. *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 2012 Oct;34 (5):257-63.
- (40) Comar M, Iannacone MR, Casalicchio G, Kay-Chopin S, Tommasino M, Gheit T. Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *J Clin Microbiol* 2012 Dec;50 (12):4041-6.
- (41) Cornall AM, Poljak M, Garland SM, Phillips S, Tan JH, Machalek DA, Quinn MA, Tabrizi SN. Anyplex II HPV28 detection and Anyplex II HPV HR detection assays are highly concordant with other commercial assays for detection of high-risk HPV genotypes in women with high grade cervical abnormalities
1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017 Mar;36 (3):545-51.

- (42) Latsuzbaia A, Tapp J, Nguyen T, Fischer M, Arbyn M, Weyers S, Mossong J. Analytical performance evaluation of Anyplex II HPV28 and Euroarray HPV for genotyping of cervical samples
1. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016 Jul;85 (3):318-22.
- (43) Lim YK, Choi JH, Park S, Kweon OJ, Park AJ. Comparison of Three Different Commercial Kits for the Human Papilloma Virus Genotyping
1. *J Clin Lab Anal* 2016 Nov;30 (6):1110-5.
- (44) Lillsunde LG, Carlsson J, Karlsson MG, Helenius G. Evaluation of HPV Genotyping Assays for Archival Clinical Samples. *J Mol Diagn* 2015 May;17 (3):293-301.
- (45) Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004 Jan;57 (1):68-72.
- (46) van der Marel J, Berkhof J, Ordi J, Torne A, del PM, van BR, Schiffman M, Wentzensen N, Jenkins D, Quint WG. Attributing oncogenic human papillomavirus genotypes to high-grade cervical neoplasia: which type causes the lesion? *Am J Surg Pathol* 2015 Apr;39 (4):496-504.
- (47) Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, Zuna RE, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Sherman ME, Wacholder S, Walker J, Wang SS. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer* 2009 Nov 1;125 (9):2151-8.

- (48) Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman M, van Doorn LJ, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis* 2011 Apr 1;203 (7):910-20.
- (49) Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis* 2014 Mar;209 (6):855-64.
- (50) Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005 Jul 20;97 (14):1066-71.
- (51) Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW. 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis* 2013 Apr;17 (5 Suppl 1):S1-S27.
- (52) Cuzick J, Ho L, Terry G, Kleeman M, Giddings M, Austin J, Cadman L, Shdoun-Barr L, Costa MJ, Szarewski A. Individual detection of 14 high risk human papilloma virus genotypes by the PapType test for the prediction of high grade cervical lesions. *J Clin Virol* 2014 May;60 (1):44-9.

- (53) Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, Koliopoulos G, Naucler P, Sankaranarayanan R, Peto J. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F88-F99.
- (54) von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Patnick J, Ronco G, Segnan N, Törnberg S, Anttila A. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research* 2015; (1):22-33.

Table 1. Absolute numbers and percentages of positivity for high-risk human papillomavirus (hr-HPV) in each diagnostic category.

Final diagnosis	HC2 (n/N)	Anyplex (n/N)	Linear Array (n/N)	GP5+/6+ (n/N)	CLART2 (n/N)
Total HPV samples	295	290	281	294	239
Negative	42/164 (25.6%)	37/161 (23.0%)	38/159 (23.9%)	20/163 (12.3%)	21/120 (17.5%)
LSIL	68/78 (87.2%)	55/76 (72.4%)	60/70 (77.9%)	32/78 (41.0%)	47/67 (70.1%)
HSIL	44/44 (100.0%)	39/44 (88.6%)	37/44 (84.1%)	35/44 (79.5%)	33/43 (76.7%)
CC*	7/9 (77.8%)	7/9 (77.8%)	6/8 (75.0%)	6/9 (66.7%)	7/9 (77.8%)

HC2: Hybrid Capture 2, Anyplex: Anyplex TMII HPV28; GP5+/6+: GP5+/6+ PCR-EIA-RH; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion; CC: cervical cancer. * Women with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma were included.

Table 2. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values (PPV and NPV) for high-grade intraepithelial lesion or carcinoma (HSIL+) of high-risk human papillomavirus (hr-HPV) detected with Hybrid Capture 2 (HC2), AnyplexTMII HPV28, Linear Array, GP5+/6+ PCR-EIA-RH and

	HC2		Anyplex		Linear Array		GP5+/6+		CLART2	
	%	(95% CI)	%	(95% CI)	%	(95% CI)	%	(95% CI)	%	(95% CI)
Sensitivity	96.1	(87.0-98.9)	86.8	(74.7-93.3)	86.0	(73.8-93.0)	78.8	(66.0-88.0)	76.5	(63.2-86.0)
Specificity	54.8	(48.5-60.9)	61.4	(55.1-67.4)	61.2	(54.8-67.2)	73.7	(67.8-79.0)	62.9	(55.8-69.5)
PPV	31.4	(24.7-39.0)	33.1	(25.7-41.4)	32.3	(25.0-40.7)	39.4	(30.6-49.0)	36.1	(27.7-45.5)
NPV	98.5	(94.7-99.6)	95.4	(90.8-97.8)	95.3	(90.6-97.7)	94.1	(89.8-96.7)	90.7	(84.4-94.6)

CLART2, assay tests.

HC2: Hybrid Capture 2, Anyplex: Anyplex TMII HPV28; GP5+/6+: GP5+/6+ PCR-EIA-RH

Table 3. Human papillomavirus (HPV) type-specific results obtained with each test compared to Annyplex TMII HPV28.

Anyplex	n	Linear Array	GP5+/6+	CLART2
HPV6	5	4 (80.0%)	-	3 (60.0%)
HPV 11	1	1 (100.0%)	-	1 (100.0%)
HPV 16	49	46 (93.4%)	46 (93.4%)	44 (89.8%)
HPV 18	5	5 (100.0%)	3 (60.0%)	3 (60.0%)
HPV 31	17	16 (94.1%)	14 (82.4%)	12 (70.6%)
HPV 33	2	1 (50.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)
HPV 35	5	5 (100.0%)	3 (60.0%)	4 (80.0%)
HPV 39	10	3 (30.0%)	4 (40.0%)	2 (20.0%)
HPV 40	2	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)
HPV 42	17	8 (47.1%)	-	0 (0.0%)
HPV 43	5	-	-	0 (0.0%)
HPV 45	3	3 (100.0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)
HPV 51	6	5 (83.3%)	2 (33.3%)	6 (100.0%)
HPV 52	12	11 (91.7%)	2 (16.7%)	10 (83.3%)
HPV 53	17	14 (82.4%)	0 (0.0%)	10 (58.8%)
HPV 54	3	3 (100.0%)	-	1 (33.3%)
HPV 56	12	8 (66.7%)	9 (75.0%)	4 (33.3%)
HPV 58	11	7 (63.6%)	8 (72.7%)	8 (72.7%)
HPV 59	10	7 (70.0%)	4 (40.0%)	6 (60.0%)
HPV 61	8	7 (87.5%)	-	7 (87.5%)
HPV 66	10	6 (60.0%)	7 (70.0%)	8 (80.0%)
HPV 68	8	2 (25.0%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)
HPV 69	1	1 (100.0%)	-	-
HPV 70	3	2 (66.7%)	-	3 (100.0%)
HPV 73	7	4 (57.1%)	2 (28.6%)	-
HPV 82	4	1 (25.0%)	-	2 (50.0%)

* Blankets correspond to HPV genotypes not included by each specific tests

Anyplex: Anyplex TMII HPV28; GP5+/6+: GP5+/6+ PCR-EIA-RH

Table 4. Risk of positive high-risk human papillomavirus (hr-HPV) test and positive result for HPV16 and/or 18 for underlying high-grade intraepithelial lesion or carcinoma (HSIL+). Results are shown with odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI).

HPV test	Result	OR (95%CI)	P
Hybrid capture	Negative	1	
	Positive	30.6 (7.2-128.53)	<0.001
Anyplex II	Negative	1	
	HPV non 16 non 18	4.3 (1.7-10.9)	0.002
	HPV16 and/or 18	31.1 (12.1-80.0)	<0.001
Linear Array	Negative	1	
	HPV non 16 non 18	3.1 (1.3-7.5)	0.012
	HPV16 and/or 18	15.3 (6.6-35.8)	<0.001
GP5+/6+	Negative	1	
	HPV non 16 non 18	5.1 (2.0-12.8)	0.001
	HPV16 and/or 18	23.2 (10.4-53.0)	<0.001
CLART2	Negative	1	
	HPV non 16 non 18	1.8 (0.7-4.5)	0.185
	HPV16 and/or 18	17.5 (7.5-40.6)	<0.001

HC2: Hybrid Capture 2, Anyplex: Anyplex TMII HPV28; GP5+/6+: GP5+/6+

PCR-EIA-RH

Estudio 2

“Value of HPV16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining to predict progression to HSIL/CIN2+ in negative cytologies from a colposcopy referral population”

Adriano RODRÍGUEZ-TRUJILLO, Cristina MARTÍ, Martina ANGELES, Adriana SIERRA, Roser ESTEVE, Adela SACO, Esther BARNADAS, Lorena MARIMÓN, Inmaculada NICOLÁS, Aureli TORNÉ, Jaume ORDI, Marta DEL PINO

American Journal of Clinical Pathology (2018). *En prensa*

The American Journal of Clinical Pathology.
AJCP Manuscript ID AJCP-2018-03-0101.R1

14-May-2018

Dear Dr. del Pino:

I am pleased to inform you that your revised manuscript, AJCP-2018-03-0101.R1, entitled, "Value of HPV16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining to predict progression to HSIL/CIN2+ in negative cytologies from a colposcopy referral population," has been reviewed by members of our editorial board and has been accepted for publication in the American Journal of Clinical Pathology.

Your paper is being prepared for publication, and you will receive galley proofs of it in due course.

Thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Clinical Pathology, and for giving us the opportunity to publish it.

With all best wishes,

Michael L. Wilson, MD

Editor

American Journal of Clinical Pathology

ASCP • 33 West Monroe • Suite 1600 • Chicago, IL 60603

FAX: 312.541.4998

Value of HPV16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining to predict progression to HSIL/CIN2+ in negative cytologies from a colposcopy referral population

Adriano Rodríguez-Trujillo, MD¹; Cristina Martí, MD¹; Martina Aida Angeles, MD¹; Adriana Sierra, MD²; Roser Esteve, PhD²; Adela Saco, MD, PhD²; Esther Barnadas, MLT³; Lorena Marimón, MLT-AD³; Inmaculada Nicolás, MD^{1,3}; Aureli Torné, MD, PhD¹; Jaume Ordi, MD, PhD^{2,3,#}; Marta del Pino, MD, PhD^{1,#}

¹ Institute Clinic of Gynaecology, Obstetrics, and Neonatology, Hospital Clínic - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

² Department of Pathology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

³ Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal), Barcelona, Spain

These authors equally contributed to the work and should share co-senior authorship.

Corresponding author: Marta del Pino, Department of Gynecology and Obstetrics, Hospital Clínic Provincial, University of Barcelona, Spain, Villarroel, 170. Esc. 5 3. 08036 Barcelona, tel: +34 637930791, E-mail address: mdelpino@clinic.ub.es.

The authors declare no conflicts of interest

Brief title: Value of HPV genotyping and p16/Ki67

Keywords: Cervical cancer, HPV genotyping, p16/Ki67 dual staining, colposcopy, random biopsy, HSIL/CIN2+.

Abstract

Objective: To assess the prognostic value of human papillomavirus (HPV) 16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining cytology in high-risk HPV (hrHPV)- positive women with no lesion or minor abnormalities.

Methods: We evaluated progression to high-grade squamous intraepithelial lesion/cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 or cervical cancer (HSIL/CIN2+), persistence/regression of hrHPV infection in women referred to colposcopy showing hrHPV infection, histology diagnosis different from HSIL/CIN2+ and negative cytology. HPV16/18 genotyping and dual staining were performed in liquid-based cytological specimens obtained on the first visit.

Results: Progression was observed in 16/200 (8.0%) women. Those with HPV16/18 infection had an increased risk of progression compared with women infected by other hrHPV types and they also showed more persistence. However, no association was observed between progression or persistence and the result of the dual staining.

Conclusions: HPV16/18-positive women with no lesion or minor abnormalities are at high risk of progression to HSIL/CIN2+ and hrHPV persistence.

Text

Introduction

Infection by high-risk human papillomavirus (hrHPV) causes over 95% of all cervical cancers (CC) and its precursor lesions, high-grade squamous intraepithelial lesion/cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 (HSIL/CIN2-3) (1). Although the vast majority of hrHPV infections are transient productive lesions that spontaneously regress, in about 10% of the cases, the HPV infection cannot be cleared(2, 3). This persistence of the virus is a necessary condition for the development of HSIL/CIN2-3 (transforming lesions) and CC (HSIL/CIN2+).

Different factors have been associated with hrHPV persistence, and therefore, with the development of HSIL/CIN2+. Women with hrHPV persistence or abnormal cytological result are considered as a group of risk for HSIL/CIN2+. Thus, according to the current guidelines (4-7) these women warrant immediate colposcopy. However, even when HSIL/CIN2+ is adequately ruled out, women with persistent hrHPV infection are still at substantial risk of HSIL/CIN2+ development over time compared with those testing negative for hrHPV(8, 9). There is no specific follow-up for hrHPV positive women with no underlying HSIL/CIN2+ and stratifying the risk of HSIL/CIN2+ in these women is particularly challenging.

One of the strategies proposed to stratify the risk of underlying HSIL/CIN2+ in women with hrHPV infection is HPV genotyping. Indeed, the risk of developing premalignant lesions and CC differs according to the hrHPV type. HPV16 is the most prevalent genotype and is associated with the highest risk of CC (10). HPV18 is the second most frequent genotype and is

especially associated with adenocarcinoma (11). In contrast, the risk of other hrHPV genotypes seems to be lower (12). Another biomarker that has been related to the risk of HSIL/CIN2+ is the combined detection of p16, a cell cycle regulatory protein that induces cell-cycle arrest under physiological conditions, and Ki67, a proliferation marker within the same cervical epithelial cell (13).

HPV 16/18 genotyping and p16/Ki67 dual staining cytology have mainly been evaluated as markers of risk of underlying HSIL/CIN2+. However, the value of these two biomarkers in the management of women with hrHPV infection in whom an underlying HSIL/CIN2+ has been adequately ruled out has not been evaluated. The aim of this study was to evaluate the prognostic value of these two biomarkers in women with a positive hrHPV test but with negative cytology results and in whom HSIL/CIN2+ was excluded at the baseline evaluation in the colposcopy clinic.

Material and methods

Study population and case selection

Prospective study conducted at referral Colposcopy Unit of the Hospital Clinic of Barcelona. From October 2009 to September 2015, women referred to the Colposcopy Unit due to an abnormal cervical cytology result within the previous 6 months were included in the study. In the first visit, a cervical sample for hrHPV testing, cytology, HPV genotyping and p16/Ki67 dual staining was obtained from all the women. They also underwent a digital colposcopy as well as at least one biopsy.

All the women fulfilling the following criteria at the baseline visit at the colposcopy clinic were included in the study: 1) a positive hrHPV test, 2)

negative cytology 3) histological diagnosis different from HSIL/CIN2+, 4) no previous HPV vaccination and 5) no HIV infection or other cause of immunosuppression. Samples without sufficient material for hrHPV genotyping and dual staining were excluded from the study. Women with abnormal cytology at the baseline visit at the colposcopy clinic were excluded from the study even if colposcopy and biopsy did not show HSIL/CIN2+ to minimize a possible bias of underdiagnosed HSIL/CIN2+. Thus, we selected only women with negative cytology in whom underlying HSIL/CIN2+ had been carefully ruled out.

The Institutional Ethical Review Board of the Hospital Clínic approved the study (HCB/2016/0672). All women provided written consent for the use of biological specimens for research purposes.

Colposcopy evaluation

A digital colposcopy was performed by experienced colposcopists using an Olympus EvisExera II CV-180 colposcope (Tokyo, Japan). First, the colposcopist applied 5% acetic acid. In order to detect “fast fader” lesions, the acetic acid was repeatedly reapplied to the cervix using cotton balls during 1 to 2 minutes. We described colposcopy findings following the criteria of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy (Rio de Janeiro 2011) (14, 15). Original squamous epithelium, columnar epithelium and the transformation zone were considered normal colposcopy findings. Smooth surface with an irregular outer border, slight acetowhite staining, slow to appear, and quick to disappear; mild, speckled partial iodine positivity and fine punctuation or fine regular mosaic were considered grade 1 changes

suggestive of LSIL/CIN1; Smooth surface with a sharp outer border; dense acetowhite staining appearing early and being slow to resolve; iodine negativity in a previously densely white epithelium; coarse punctuation or wide irregular mosaic; and dense acetowhite staining of the columnar epithelium were considered grade 2 changes suggestive of HSIL/CIN2-3 . We recorded the size of the lesion according to the quadrants of the cervix involved.

During the colposcopy evaluation at least one biopsy was obtained. Up to four biopsies were collected from different abnormal areas or from different regions in one large complex abnormal area of the cervix. If less than four colposcopy-directed biopsies were taken, a random biopsy (non-targeted biopsy) from apparently normal epithelium from the transformation zone was also taken (16). Endocervical curettage using a Kervokian curette was performed in all women with a non-completely visible transformation zone.

Liquid-based cytology

A cytobrush was used to collect cervical samples and they were stored in PreservCyt solution (Hologic Corp, Marlborough, MA, USA) for ThinPrep liquid-based cytology and hrHPV testing. We used the Thin-Prep T2000 slide processor (Hologic) to prepare thin-layer cytology slides and they were stained using the Papanicolaou method. A cytotechnologist evaluated the cytology slides, and then a pathologist confirmed the result using the revised Bethesda nomenclature (17). Subsequently, samples were centrifuged. The pellets were stored at -80 °C until further processing.

DNA isolation, hrHPV detection and genotyping

DNA isolation from the cervical samples kept in PreservCyt was

performed using the Qlamp Minelute Virus Spin kit (QIAgen Inc., Valencia, CA, USA) according to manufacturer's protocol (18). In brief, 10 µl of the isolated DNA were amplified by GP5+/6+ PCR and 5 µl of GP5+/6+ amplifiers were used for hrHPV detection by the enzyme immunoassay (Diassay, Rijswijk, The Netherlands). The cut-off value to classify samples as positive for hrHPV was three-fold the mean optical density of the PCR-negative controls ($OD \leq 0.120$).

Individual hrHPV genotypes of enzyme immunoassay-positive samples were identify using the commercially available LMNX Genotyping kit HPV GP HR (Labo Bio-medical Products B.V. Rijswijk, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions (18, 19). Briefly, the biotinylated PCR products were hybridised to HPV type-specific probes attached to colour-coded beads, targeting 18 hrHPV types: HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 and 82.

p16/Ki67 dual staining

Immunohistochemical p16/Ki67 dual staining was performed with the automated immunohistochemistry Tech-Mate 500 (Dako Co, Carpinteria, California) using the CINtec Plus kit (Roche-mtm Laboratories, Heidelberg, Germany) according to manufacturer's instructions (20, 21). The slides were run in batches of 24 and subsequently evaluated by a trained cytotechnologist. To confirm the presence of the minimum criteria for squamous cellularity as defined by the Bethesda 2001 terminology an initial evaluation was performed (17). Subsequently, the slides were interpreted as positive by dual staining analysis, independently of the morphological

interpretation, when the presence of double immunoreactive cervical epithelial cells (i.e. cells with simultaneous brown cytoplasmic p16 and red nuclear Ki67 immunostaining) was detected. All the slides with dual staining-positive cell(s) were reviewed by a pathologist co-author of this paper (JO) to confirm the result. The observers evaluating the p16/Ki67 dual staining were blinded to the results of the Papanicolaou stained cytology and the hrHPV testing (22).

Histological diagnosis

All the histological samples were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin following routine procedures. We use hematoxylin and eosin (H&E) to stain formalin-fixed, paraffin-embedded 4 µm sections. Our pathologist (JO) reviewed all the histological samples to confirm or exclude the presence or absence of SIL/CIN and its grade. Pure morphologic criteria based on the H&E-stained sections was used to establish the histological diagnoses and always with no prior knowledge of HPV status or the cytology result. Biopsy specimens were classified as normal, low-grade SIL/CIN (LSIL/CIN1) and HSIL/CIN2+ according to the LAST criteria (1). p16 immunohistochemical staining was performed in all the cervical samples obtained. A positive block staining for p16 in the dysplastic area was required for the diagnosis of HSIL/CIN2+.

Follow-up protocol

Follow-up visits consisted in cytology, hrHPV testing, and colposcopy and were scheduled every 6 months. In case of an abnormal cytological result detected during follow-up, new colposcopy-directed biopsies, random biopsies of the transformation zone or endocervical curettage were performed.

Colposcopy-directed biopsies were also repeated when worsening of the colposcopic pattern was identified during follow-up.

Women with a confirmed histological diagnosis of HSIL/CIN2+ underwent excisional treatment by loop excision of the transformation zone and abandoned the study. In cases in which all the tests became negative during follow-up, the women returned to routine screening.

Final outcome and diagnostic criteria

Progression was defined as HSIL/CIN2+ or adenocarcinoma *in situ* histologically diagnosed at any time during follow-up. Persistence was defined as a positive hrHPV testing result, and/or persistent cytological abnormalities, and/or histological diagnosis of LSIL/CIN1 at the end of follow-up. Regression was defined as a negative hrHPV testing result, and negative Pap test result, and, if available, a negative histologic diagnosis at the end of follow-up.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS version 20.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Categorical variables are presented as absolute number and percentages and compared using the Chi-square or Fisher's exact test. Continuous variables are presented as mean and standard deviation and were compared using the ANOVA test. Kaplan-Meier curves and Cox models were used to analyse the risk estimation of progression to HSIL/CIN2+ and of regression of hrHPV infection at the end of follow-up. *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Two hundred and eighteen women fulfilled the inclusion criteria. Eighteen women were excluded because of the lack of sufficient material for biomarker assessment. Thus, 200 women were finally included in the study. The mean age of the overall group was 38.4 years (+/- standard deviation 11.9).

The median follow-up period was 23.9 months (range 6.1-65.8). Progression to HSIL/CIN2+ was observed during follow-up in 16 (8%) women. The median time from the baseline visit to progression was 18.5 months (range 6.1-65.6). In 76 (38%) women, the hrHPV infection or the cytological abnormality persisted at the end of the follow-up period, and in 108 (54%) women infection regressed during follow-up.

The clinical characteristics (age, smoking habits, result of the referral Pap test, abnormal colposcopy findings at the first visit) as well as the results of the biomarkers analyzed (HPV genotyping and p16/Ki67 dual staining) upon entry in the study according to the main outcomes are shown in Table 1. Women showing progression and persistence were older than those showing regression. The colposcopy pattern at the first visit was not associated with the risk of progression. HPV16/18 was identified in 55 women, and hrHPV types other than 16/18 were identified in 145 women. Women testing positive for HPV16/18 were at higher risk of progression and persistence than those positive for other hrHPV types (20% and 40% vs. 7.9% and 28.6%, respectively; $p=0.003$). A positive result for p16/Ki67 dual staining was identified in 25 women. No association was observed between progression, persistence or regression and the result of the p16/Ki67 dual staining.

Figure 1 shows the cumulative incidence of progression to HSIL/CIN2+ in women with infections by HPV16/18 and by other hrHPV types. The cumulative risk of progression was higher in women with HPV16/18. Similarly, the risk of regression of hrHPV infection was significantly lower in women with HPV16/18 infection (Figure 2).

The risk of progression according to age, referral cytology, abnormal colposcopy findings at the first visit, HPV16/18 genotyping and dual staining results at the first visit are shown in Table 2. In the univariate analysis, HSIL referral cytology (HR 4.0; 95% CI 1.3-12.0) and HPV16/18 (HR 3.7; 95% CI 1.3-10.4) were associated with the risk of progression. In the multivariate analysis, only HPV16/18 was identified as an independent risk factor of progression to HSIL/CIN2+ (HR 3.0; 95% CI 1.0-9.1).

Table 3 shows the clinical characteristics of the 16 women who progressed to HSIL/CIN2+ during follow-up. Six of these women (37.5%), showed an abnormal colposcopy pattern at the first evaluation. At progression to HSIL/CIN2+ the colposcopy was abnormal in 7/16 (43.8%) women. In 15/16 women who progressed to HSIL/CIN2+, the biopsy performed during follow-up showed abnormal cytology. In these women there was a change in the colposcopic evaluation compared with first visit. In one woman, the biopsy was performed at follow-up because of grade 1 changes in a previously normal colposcopic pattern. In the nine women with a normal colposcopic pattern at progression, the lesion was detected by a random biopsy of the transformation zone.

Of the 108 women showing regression during the follow-up, all 66 who

had a normal colposcopy pattern at the first visit showed a normal colposcopy at the end of follow-up. Of the 40 (85%) women showing grade 1 changes at the first colposcopy, 34 presented a normal colposcopy at the end of the follow-up, whereas in 6 (15%) the grade 1 changes persisted. Of the two women with regression and grade 2 changes at the initial colposcopy, one had a normal colposcopy at the end of follow-up and the other showed grade 1 changes.

Discussion

The present study shows that HPV16/18 genotyping can identify the subset of women at high risk of progression to HSIL/CIN2+ and long-term persistence of hrHPV infection in hrHPV-positive women referred to colposcopy with no evidence of HSIL/CIN2+ and a negative cytology result at the initial visit. In contrast, dual staining cytology was found to add very little or no information. To our knowledge, this is the first study to evaluate and compare the predictive value of these two biomarkers in women with hrHPV infection in whom a HSIL/CIN2+ has been adequately ruled out and with no cytological abnormalities at the baseline visit.

The risk of developing transforming lesions varies for the different hrHPV types. HPV16 and HPV18 have a high capacity of persistence (10, 11). Thus, their detection has been shown to be a risk factor of either underlying or progression to HSIL/CIN2+. The study with the longest follow-up (10 years) published to date showed a cumulative risk of progression to HSIL/CIN2 of 20.7% for women with HPV16, 17.7% for women with HPV18 infection, and only 3% for women with other hrHPV genotypes (23). It has also been

estimated that in women who are positive for HPV16/18, even with normal cytology the risk of progression to HSIL/CIN2+ at 3 years is about 19.8%, being higher than the 7.9% observed in women with infections by other hrHPV genotypes(5, 24)._These figures are in keeping with the results observed in the present series, showing that women with HPV16/18 infection have a cumulative risk of 16% for developing HSIL/CIN2+ at two years of follow-up. Moreover, in the present study, women with HPV16/18 infections had a lower probability of regression compared with those with other hrHPV infections (36.3% vs. 60.7%). These results have also been observed in previous studies (23, 25), and suggest that progression to HSIL/CIN2+ likely increases over time.

Several studies have reported that p16/Ki67 dual staining may improve the detection of HSIL/CIN2+ when it is performed as a secondary tool in the triage of hrHPV-positive women (22, 26). p16/Ki67 dual staining has also been evaluated in women with mild abnormalities in the Pap cytology, with promising results in terms of diagnosis of HSIL/CIN2+ (20, 21, 27, 28). In women with hrHPV infection and a negative cytology result some studies have shown that p16/Ki67 dual staining is an adequate predictor of progression, with a 5-year cumulative incidence risk of HSIL/CIN2+ of 23%, which is higher than the 5% risk reported in women showing negative dual staining cytology (29, 30). All these studies included women participating in population-based cervical cancer screening with a negative cytology and a positive hrHPV test. In contrast, in_our study p16/Ki67 dual staining did not provide any information about the risk of progression or persistence. Remarkably, all the women included in our series not only had a negative

cytology but also a complete colposcopic examination, which excluded an underlying HSIL/CIN2+. The different characteristics of the women included in these studies might justify the discordance. On the other hand, other studies showing a higher risk of progression for women with a positive p16/ki67 test found a correlation between HPV 16 infection and positive p16/ki67 staining, suggesting that the prognostic value of this biomarker may have been overestimated (31).

In our study, the colposcopy pattern at the first visit was not associated with the risk of progression. These results are in keeping with previously published studies (3). Only seven out of the 16 women that progressed to HSIL/CIN2+ during follow-up presented an abnormal colposcopy at the time of HSIL/CIN2+ diagnosis. In six of these women the altered pattern was already present at the first visit (5 women with grade 1 changes and one with grade 2 changes), although the histological study was normal or showed LSIL/CIN1. Only one additional woman developed an abnormal colposcopy pattern (changes grade 1) during follow-up. Therefore, nine HSIL/CIN2+ were not evident at the colposcopy examination. Previous studies have suggested that non-targeted biopsy (random biopsies) of the transformation zone may detect colposcopically non-visible HSIL/CIN2+ and should be considered in women with HPV16/18 infection due to their higher risk of developing HSIL/CIN2+ (16, 32). Recently, the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) published the Colposcopy Standards recommendations addressing the role of colposcopy and the performance of biopsy sampling for CC prevention. In spite of its possible limitations, colposcopy is considered the gold standard to guide biopsy sampling in these women (16, 33).

However, the new colposcopy guidelines suggest that random biopsies of the transformation zone should be recommended to women at very high risk of HSIL/CIN2+ (high-grade cytology, HPV16/18 infection, abnormal colposcopy appearance) (34).

The high proportion (31.2%) of HSIL referral cytology among the women who progressed to HSIL/CIN2+ suggests the presence of occult and colposcopically non-visible HSIL/CIN2-3. However, the probability of missing an underlying HSIL/CIN2+ was extremely low in these women since very accurate colposcopic and biopsy evaluation was performed, including colposcopy-directed biopsy of all abnormal areas, a random biopsy of the transformation zone when fewer than 4 biopsies had been obtained and endocervical curettage when the transformation zone was not completely visible. Moreover, in the four women referred for HSIL cytology who progressed to HSIL/CIN2+, the time from the baseline visit to progression (range 11.1-21.6 months) suggests that progression to HSIL/CIN2+ is more likely than the presence of an underlying high-grade lesion. These findings suggest that close follow-up should be recommended in women with HSIL cytology result, and that random biopsies of the transformation zone or endocervical curettage should be performed in these women, even in the absence of an altered colposcopy pattern to rule out occult HSIL/CIN2+ (16, 33).

The main strength of this study is that all women were prospectively recruited and followed over a long period (2 years). Moreover, a well-defined follow-up routine was established, which included liquid-based cytology, hrHPV testing, and colposcopy every 6 months with directed and/or random

biopsies of the transformation zone, and endocervical curettage in the case of an HSIL result in the Pap test or significant worsening in the colposcopy study. This close follow-up allowed early diagnosis of HSIL/CIN2+ development. Another strength of this study is that, cytological evaluations, hrHPV testing, HPV genotyping and p16/Ki67 dual staining were performed in the same laboratory by the same experienced team of pathologists and cytotechnicians. This is especially relevant regarding the cytology evaluation, because of its known inter-observer variability, inherent to all morphological techniques (35). The main limitation of this study is the relatively small number of women included, which may have resulted in a very small number of women who progressed to HSIL/CIN2+. However, the percentage of women showing progression is in keeping with that observed in previous reports (16, 34, 36). In order to be as accurate as possible excluding possible underlying HSIL/CIN2+ only women showing a negative cytology result at the first visit were finally included, and all women with cytological mild abnormalities at the initial visit were excluded. It has been shown that HSIL/CIN2+ may be found in up to 16% of women with hrHPV infection and cytologically mild abnormalities (14). An Abnormal colposcopy pattern was not considered an exclusion criteria because an accurate histological evaluation of all abnormal patterns, random biopsies from areas no suggestive of HSIL/CIN2+ and endocervical evaluation in all cases in which the transformation zone could not be properly assessed was performed.

Conclusions

HPV16/18 genotyping in women with a positive hrHPV test with no lesion or minor abnormalities at referral colposcopy is able to identify a subset

of women with an increased risk of progression to HSIL/CIN2+ and persistence of the hrHPV infection, while dual staining cytology seems to add very little information. These results suggest that close follow-up of women with HPV16/18 infection would allow earlier diagnosis of premalignant lesions. Random biopsies of the transformation zone or endocervical curettage should be considered in the study of women with HPV16/18 infection due to the high risk of HSIL/CIN2+ development not always visible in the colposcopic evaluation.

Funding

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (ICSIII)-Fondo de Investigación Sanitaria and ERDF 'One Way to Europe' (PI15/00546 and PI17/00772).

Acknowledgments

The authors want to thank Annika Spruijt for her technical assistance. We also thank all the colposcopists, laboratory personnel, and the women who participated in this study as well as Donna Pringle for the English revision of the manuscript.

Author contributions

- Adriano Rodríguez: Conceptualization, data curation, methodology, formal analysis, writing-original draft.
- Cristina Martí: Methodology
- Martina Ángeles: Data curation, Methodology
- Adriana Sierra: Methodology
- Roser Esteve: Methodology
- Adela Saco: Methodology
- Esther Barnadas: Methodology
- Lorena Marimón: Methodology
- Inmaculada Nicolás: Methodology
- Aureli Torné. Conceptualization, project administration, methodology writing - review
- JaumeOrdi: Funding acquisition, project administration, methodology, writing - review
- Marta del Pino: Conceptualization, project administration, methodology writing - review

References

1. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(10):1266-97.
2. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *British journal of cancer*. 2000;83(5):561-5.
3. del Pino M, Torne A, Alonso I, et al. Colposcopy prediction of progression in human papillomavirus infections with minor cervical lesions. *Obstetrics and gynecology*. 2010;116(6):1324-31.
4. Dijkstra MG, Snijders PJ, Arbyn M, Rijkaart DC, Berkhof J, Meijer CJ. Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(5):927-35.
5. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecologic oncology*. 2015;136(2):189-97.
6. Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *International journal of cancer*. 2012;130(3):602-10.

7. Torné A; Del Pino M CM, Alameda F, et al. Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *ProgObstetGinecol*. 2014;57(Supl. 1):1-53.
8. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol*. 2011;12:663-672.
9. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, et al. Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women who test Pap-negative but are HPV-positive. *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17:S56-S63.
10. Schiffman M, Glass AG, Wentzensen N, et al. A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:1398-1409.
11. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010;11:1048-1056.
12. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;88:63-73.
13. Tjalma WAA. Diagnostic performance of dual-staining cytology for cervical cancer screening: a systematic literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;210:275-280.
14. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, et al. 2011 Colposcopic terminology of

the international federation for cervical pathology and colposcopy. *Obstet Gynecol.* 2012;120:166-172.

15. Tatti S, Bornstein J, Prendiville W. Colposcopy: a global perspective: introduction of the new IFCCPC colposcopy terminology. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2013;40:235-250.

16. van der Marel J, van Baars R, Rodriguez A, et al. The increased detection of cervical intraepithelial neoplasia when using a second biopsy at colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2014;135:201-207.

17. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-2119.

18. Geraets DT, Heideman DA, de Koning MN, et al. Highthroughput genotyping of high-risk HPV by the digene HPV genotyping LQ test using GP5+/6+-PCR and xMAP technology. *J Clin Virol.* 2009;46(suppl 3):S21-S26.

19. Halfon P, Lindemann ML, Raimondo A, et al. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia using the digene HPV genotyping LQ test. *Arch Virol.* 2013;158:1143-1149.

20. Waldstrøm M, Christensen RK, Ørnskov D. Evaluation of p16(INK4A)/Ki-67 dual stain in comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathol.* 2013;121:136-145.

21. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4154-4162.

22. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, et al. Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol.* 2014;122:227-235.
23. 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;97:1072-1079.
24. Thomsen LT, Frederiksen K, Munk C, et al. Long-term risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse according to high-risk human papillomavirus genotype and semi-quantitative viral load among 33,288 women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 2015;137:193-203.
25. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis.* 2005;191:731-738.
26. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, et al. p16/Ki-67 dual stain cytology for detection of cervical precancer in HPVpositive women. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107:djv257.
27. Loghavi S, Walts AE, Bose S. Cintec® PLUS dual immunostain: a triage tool for cervical Pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol.* 2013;41:582-587.
28. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, et al; European CINtec Cytology Study Group. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology: results from the European Equivocal or Mildly

Abnormal Papanicolaou Cytology Study. *Cancer Cytopathol.* 2011;119:158-166.

29. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al. Triaging HPVpositive women with normal cytology by p16/Ki-67 dualstained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer.* 2015;136:2361-2368.

30. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 dual-stained cytology. *Gynecol Oncol.* 2011;121:505-509.

31. Vrdoljak-Mozetič D, Krašević M, Verša Ostojić D, et al. HPV16 genotype, p16/Ki-67 dual staining and koilocytic morphology as potential predictors of the clinical outcome for cervical low-grade squamous intraepithelial lesions. *Cytopathology.* 2015;26:10-18.

32. Nam K, Chung S, Kwak J, et al. Random biopsy after colposcopy-directed biopsy improves the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *J Low Genit Tract Dis.* 2010;14:346-351.

33. Massad LS, Collins YC. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol.* 2003;89:424-428.

34. Wentzensen N, Schiffman M, Silver MI, et al. ASCCP colposcopy standards: risk-based colposcopy practice. *J Low Genit Tract Dis.* 2017;21:230-234.

35. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 2006;119:1095-1101.

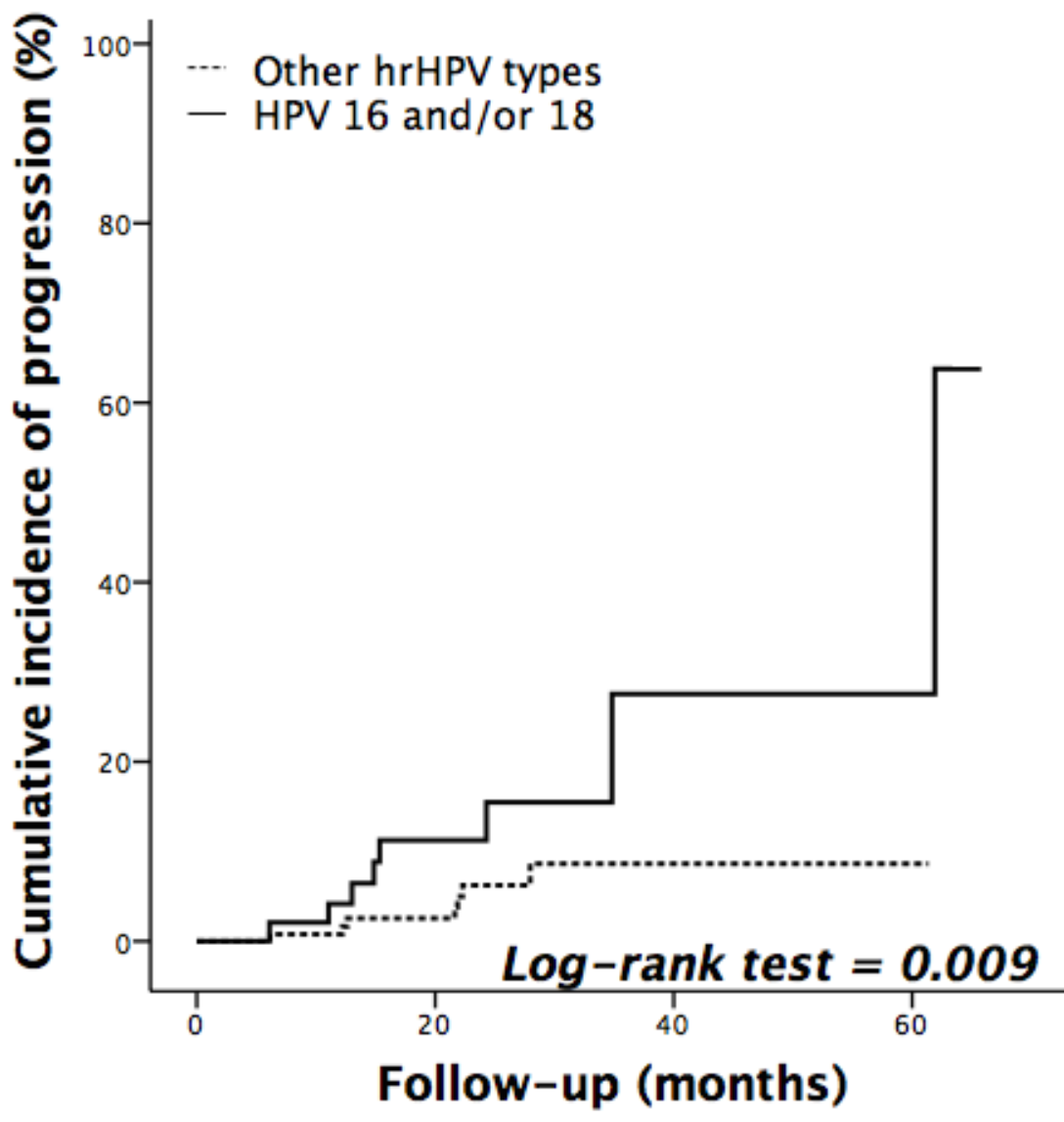
36. van der Marel J, Rodriguez A, Del Pino M, et al. The value of endocervical curettage in addition to biopsies in women referred to

colposcopy. J Low Genit Tract Dis. 2015;19:282-287.

Figure legends

Figure 1. Cumulative incidence of progression to high-grade squamous intraepithelial lesion/cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 or cervical carcinoma in women with risk human papillomavirus (HPV) 16/18 infection and in women with infections by other high-risk HPV types.

Figure 2. Cumulative incidence of regression of high-risk human papillomavirus (hrHPV) infection in women with HPV 16/18 infection and in women with infections by other hrHPV types.



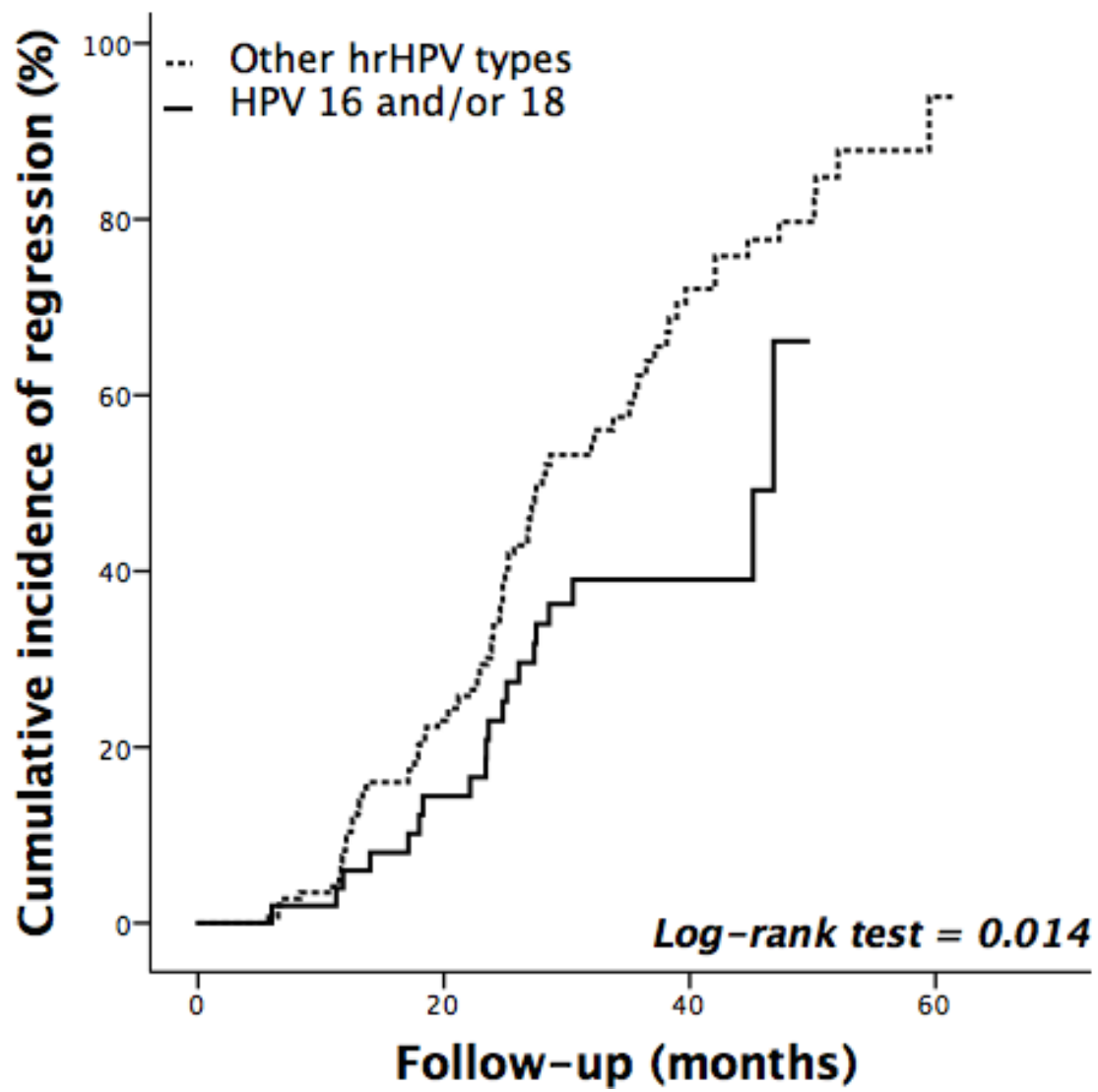


Table 1. Clinical characteristics and results of the biomarkers (human papillomavirus [HPV] genotyping and p16/Ki67 dual staining) at the first visit of the women included in the study

	n	Regression	Persistence	Progression	p
Age (years)	200	36.8±10.8	39.7±12.9	44.4±12.3	0.036
Smoking habit					0.144
Non-smoker	98	47 (48.0)	44 (44.9)	7 (7.1)	
Smoker	102	61 (59.8)	32 (31.4)	9 (8.8)	
Referral cytology					0.123
Negative	64	34 (53.1)	27 (42.2)	3 (4.7)	
LSIL	112	64 (57.1)	40 (35.7)	8 (7.2)	
HSIL	24	10 (41.7)	9 (37.6)	5 (20.7)	
Abnormal colposcopy findings at first visit					0.318
No	132	66 (50.0)	56 (42.4)	10 (7.6)	
Grade 1	63	40 (63.5)	18 (28.6)	5 (7.9)	
Grade 2	5	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	
HPV genotyping					0.003
Other high-risk types	145	88 (60.7)	51 (35.2)	6 (4.1)	
16 and/or 18	55	20 (36.3)	25 (45.5)	10 (18.2)	
p16/Ki67 dual staining					0.814
Negative	175	96 (54.9)	65 (37.1)	14 (8.0)	
Positive	25	12 (48.0)	11 (44.0)	2 (8.0)	

Age is presented as mean ± standard deviation. Categorical variables are presented as absolute number and (%); HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL: low-grade intraepithelial squamous lesion.

Table 2. Univariate and multivariate Cox model for the risk of progression to high-grade squamous intraepithelial lesion/cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 or cervical carcinoma (HSIL/CIN2+) according to age, referral cytology, abnormal colposcopy findings at first visit, human papillomavirus (HPV) genotyping and p16/Ki67 dual staining

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	(95% CI)	<i>P</i>	HR	(95% CI)	<i>P</i>
Age						
≤ 35 years	1					
> 35 years	1.2	(0.4-3.4)	0.767			NA
Referral cytology						
Negative	1			1		
LSIL	0.7	(0.1-3.0)	0.587			NA
HSIL	4.0	(1.3-12.0)	0.013	3.0	(0.9-9.3)	0.058
Abnormal colposcopy findings at first visit						
No	1					
Grade 1	0.8	(0.2-3.1)	0.779			NA
Grade 2	2.7	(0.3-20.7)	0.337			NA
HPV genotype						
Other high-risk types	1			1		
16 and/or 18	3.7	(1.3-10.4)	0.015	3.0	(1.0-9.1)	0.047
p16/Ki67 dual staining						
Negative	1					
Positive	1.1	(0.2-5.0)	0.879			NA

HR: Hazard ratio; CI: confidence interval; NA: Not applicable.

Table 3. Clinical characteristics of the 16 women who progressed to high-grade squamous intraepithelial lesion/cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 or cervical carcinoma (HSIL/CIN2+) during follow-up

Woman	Referral cytology	Results at first visit					Results at progression				Time to progression (months)
		Cytology	Colposcopy	Biopsy	HPV genotyping	p16/Ki67 dual staining	Cytology	Colposcopy	Biopsy		
1	Negative*	Negative	Normal	Negative	Other hrHPV	Positive	Negative	Grade 1	HSIL/CIN2	34.8	
2	HSIL	Negative	Normal	LSIL/CIN1	Other hrHPV	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN3	6.1	
3	Negative*	Negative	Normal	Negative	Other hrHPV	Negative	ASC-US	Normal	HSIL/CIN2	12.6	
4	HSIL	Negative	Normal	Negative	Other hrHPV	Negative	ASC-US	Normal	HSIL/CIN2	21.6	
5	HSIL	Negative	Normal	Negative	HPV 16/18	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN3	15.3	
6	LSIL	Negative	Normal	Negative	HPV 16/18	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN2	65.6	
7	LSIL	Negative	Normal	Negative	Other hrHPV	Negative	ASC-H	Normal	HSIL/CIN2	21.9	
8	LSIL	Negative	Normal	LSIL/CIN1	Other hrHPV	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN2	28.0	
9	LSIL	Negative	Normal	LSIL/CIN1	HPV 16/18	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN3	61.9	
10	LSIL	Negative	Normal	Negative	HPV 16/18	Negative	HSIL	Normal	HSIL/CIN2	17.9	
11	HSIL	Negative	Grade 1	Negative	HPV 16/18	Negative	HSIL	Grade 1	HSIL/CIN2	11.1	
12	LSIL	Negative	Grade 1	Negative	HPV 16/18	Negative	HSIL	Grade 1	HSIL/CIN2	24.3	
13	Negative*	Negative	Grade 1	Negative	HPV 16/18	Negative	LSIL	Grade 1	HSIL/CIN3	22.3	
14	LSIL	Negative	Grade 1	LSIL/CIN1	HPV 16/18	Negative	LSIL	Grade 1	HSIL/CIN2	13.0	
15	LSIL	Negative	Grade 1	LSIL/CIN1	HPV 16/18	Negative	LSIL	Grade 1	HSIL/CIN2	18.5	
16	HSIL	Negative	Grade 2	Negative	HPV 16/18	Positive	HSIL	Grade 2	HSIL/CIN2	14.9	

* Positive result for high risk human papilloma virus (hrHPV); LSIL: Low-grade intraepithelial lesion; ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-H: ASC-cannot exclude high-grade intraepithelial lesion; CIN: Cervical intraepithelial neoplasia

V. DISCUSIÓN GENERAL

En los últimos años, la utilización de la prueba de detección del Virus del Papiloma Humano (VPH), tanto en los programas de cribado como en el manejo clínico de mujeres con alto riesgo de presentar lesiones cervicales de alto grado, ha permitido aumentar la sensibilidad para la detección del CCU y sus lesiones precursoras y, por tanto, reducir la incidencia de las mismas^{32,77,102-104}. Sin embargo, como contrapartida, la especificidad para este propósito se reduce con esta prueba, hecho que conlleva realizar seguimiento a un número significativo de mujeres con infección transitoria por VPH-de alto riesgo oncogénico (-AR) que no desarrollarán ninguna lesión⁵⁴.

Por ello, en los últimos años ha tomado especial relevancia el estudio de marcadores moleculares de infección del VPH que permitan subsanar esta pérdida de especificidad, evitando así la sobrecarga asistencial y sobretratamiento de mujeres con bajo riesgo.

En el primer estudio comparamos el rendimiento clínico y analítico de cinco test de detección (HC2, Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) y además genotipado de VPH (todos excepto HC2) para el diagnóstico de HSIL/CIN2+ en mujeres remitidas a una unidad de colposcopia por un cribado positivo. La captura de Híbridos (HC2), test de referencia, presentó la mejor sensibilidad, y de entre los test que incluyen genotipado, Anyplex y Linear Array fueron los que mostraron una sensibilidad del 90% con respecto a la HC2. En cuanto a la especificidad, todos los test mostraron valores superiores a la HC2, siendo la mejor especificidad la que presentó GP5+/6+, que fue casi de un 20% más que el HC2. Estos resultados concuerdan con los observados en estudios previos realizados en población de cribado con alteraciones citológicas menores¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Los requerimientos para la validación de los test VPH como herramienta primaria en el cribado de CCU según los trabajos internacionales son: una sensibilidad para la detección de HSIL/CIN2+ $\geq 90\%$ y una especificidad $\geq 98\%$ con respecto a la HC2 en mujeres mayores de 30 años; una buena reproducibilidad intralaboratorio; y una concordancia interlaboratorio con un límite inferior del intervalo de confianza $\geq 87\%$ ⁴³. Por tanto, según los resultados obtenidos en nuestro estudio, tanto Anyplex como Linear Array podrían ser candidatos para utilizarse en programas de cribado al cumplir los criterios de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad intralaboratorio. Por contra, ni CLART2 ni GP5+/6+ lo podrían ser al no cumplir el requisito de la sensibilidad.

GP5+/6+ podría tener, por su alta especificidad, especial interés en el manejo de mujeres menores de 30 años. Este test podría servir para descartar lesiones de HSIL/CIN2-3 con menor probabilidad de progresión. Hay que tener en cuenta que el objetivo de los programas de cribado es reducir la mortalidad por CCU y para ello, identificar aquellas lesiones premalignas con capacidad de progresar a carcinoma invasor. La prevalencia de HSIL/CIN2-3 aumenta a medida que lo hace la edad, estimándose una prevalencia de 0,1% entre los 20-29 años y de 0,6% entre los 50-59 años³⁷. Sin embargo, la tasa de regresión espontánea de las HSIL/CIN2-3 en mujeres menores de 25 años es de hasta el 65% y únicamente un 5% de ellas tienen riesgo de progresión a lesión invasora a largo plazo¹⁰⁸. Este dato está en concordancia con los resultados del segundo trabajo de la tesis, en el que encontramos que la media de edad es mayor en aquellas mujeres en las que la infección persiste y además progresa a HSIL/CIN2+, apoyando la

necesidad de pruebas de cribado con mayor especificidad en el grupo de mujeres más jóvenes.

Tanto la concordancia entre positividad/negatividad de los diferentes test de genotipado con la HC2, como la concordancia entre los genotipos identificados por cada test fue $\geq 80\%$, con genotipos diferentes en menos del 5% de muestras VPH positivas, lo que da validez interna a estos test. Estos datos de concordancia entre los test también concuerdan con los trabajos previamente publicados al respecto^{107,109-114}.

La tasa de infecciones múltiples identificadas de forma global por los test de genotipado objetos de nuestro primer estudio fue significativamente diferente entre ellos, pero en el rango del 15-50% publicado en trabajos anteriores¹¹⁵⁻¹¹⁷, en los que la tasa de infección múltiple también es muy variable. La evidencia científica disponible sugiere que la carga de infección múltiple es mayor en las mujeres más jóvenes y en lesiones productivas, mientras que en las lesiones invasoras la tasa de infección múltiple es menor, lo que sugiere que la co-infección ocurre al azar y que cada genotipo conduce de forma independiente a una lesión en el cuello de útero. En este sentido, en nuestro trabajo, GP5+/6+ fue el test que detectó menos infecciones múltiples, un 20,4%, con similares valores de eficacia diagnóstica para diagnosticar HSIL/CIN2+ con respecto al resto de test estudiados. Este hallazgo aporta un valor añadido a GP5+/6+ al descartar infecciones presentes en la superficie del cuello de útero que incluyen posibles infecciones transitorias y depósitos de ADN de VPH resultado de las relaciones sexuales sin interés clínico¹¹⁶.

Por tanto, en base a nuestro datos que muestran una alta

concordancia entre los test y una similar sensibilidad clínica para el diagnóstico de HSIL/CIN2+, se deben considerar otras características para la elección del test más adecuado para cada propósito. Así, Anyplex y Linear Array, por su mayor sensibilidad, serían los mejores test para utilizar como herramienta primaria de cribado y test como GP5+/6+, e incluso CLART2, por su mayor especificidad, serían más útiles en el manejo de pacientes menores de 30 años.

Otro dato a tener en cuenta dentro del planteamiento de un cribado basado en la determinación del VPH es la pérdida de especificidad de los test de VPH con respecto a la citología en el cribado primario. Por ello, las guías actuales, tanto americanas como europeas, recomiendan realizar una selección de las mujeres con infección VPH que presenten mayor riesgo de HSIL/CIN2-3 subyacente, que sería las que se beneficiarían de una colposcopia inmediata. Para ello se han propuesto varios biomarcadores como el genotipado para VPH 16/18 o la tinción dual p16/Ki67^{41,79,80,118}.

Diversos estudios sugieren una mejora de la especificidad con similar sensibilidad al combinar el resultado de la citología, incluso cuando ésta es negativa, con el genotipado VPH 16/18 en mujeres VPH-positivas para el diagnóstico de HSIL/CIN2+^{119,120}. El VPH 16 es el genotipo más prevalente y el que mayor asociación a cáncer de cuello de útero ha demostrado debido a su alta capacidad de persistencia, condición necesaria para el desarrollo del mismo⁷⁵. Menos prevalente, pero el segundo en frecuencia, es el VPH 18, que está especialmente asociado a las neoplasias cervicales de origen glandular. De hecho estos dos genotipos son los responsables de alrededor del 70% de los cánceres a nivel mundial⁷⁶. Los resultados del primer trabajo

de esta tesis están en concordancia con estos datos. En el trabajo evaluamos el riesgo de HSIL/CIN2+ subyacente tanto de una prueba HC2 positiva como de un genotipado positivo para VPH 16/18 con los diferentes test. La identificación de estos dos genotipos, con cualquiera de los test evaluados, confiere mayor riesgo para presentar HSIL/CIN2+ subyacente con respecto al resto de genotipos de alto riesgo, por tanto, confirma su utilidad en la selección de mujeres con prueba VPH positiva.

Incluso, como herramienta única de cribado primario, especialmente en mujeres mayores en las que la posibilidad de aclaramiento del virus es menor, el genotipado VPH 16/18 ha demostrado ser más eficaz que la citología¹²¹. Por tanto, la identificación específica de estos dos genotipos parece ser una buena estrategia para la selección de mujeres con elevado de riesgo de HSIL/CIN2+ subyacente, ya que se beneficiarían de estudio colposcópico inmediato y eventual tratamiento precoz. De hecho, esta estrategia de selección se encuentra, junto con la tinción dual p16/Ki67 en la citología y la detección del ARNm de E7, en la guías clínica de nuestro país para la selección de mujeres VPH-positivas con citología normal, como alternativa a repetir el co-test en un año, que podría incurrir en un retraso en el diagnóstico de lesiones premalignas, además de la posible ansiedad asociada a la espera⁸⁰. Los datos que aporta nuestro trabajo pueden ayudar a decidir, de entre los marcadores moleculares propuestos en las guías, cual es el mejor para la estratificación del riesgo en este subgrupo, que representan aproximadamente el 4% de las mujeres mayores de 30 años¹²². De entre ellos, el genotipado VPH 16/18 con Anyplex es el que se asoció al mayor riesgo de HSIL/CIN2+ subyacente. Este riesgo es incluso superior al

que otorga la positividad del HC2 y llega a ser el doble de test como el Linear Array.

Posiblemente, la mayor limitación de nuestro primer trabajo es la falta de seguimiento para evaluar la posible relación entre los distintos genotipos detectados por cada test y el riesgo de desarrollar HSIL/CIN2+. En este sentido, las guías clínicas actuales no contemplan diferentes algoritmos de seguimiento en función el genotipo de VPH aislado. Por consiguiente, en nuestro segundo estudio comparamos, ya no el valor diagnóstico, sino el valor pronóstico del genotipado VPH 16/18 utilizando GP5+/6+ y otro de los marcadores moleculares de infección por VPH, la citología con tinción dual p16/Ki67.

Sabemos que, incluso habiendo descartado adecuadamente un HSIL/CIN2+, las mujeres con infección VPH persistente siguen presentado mayor riesgo de desarrollar un CCU a lo largo del tiempo comparado con aquellas mujeres VPH-AR-negativas. Esto se debe a que el riesgo de CCU y de sus lesiones precursoras varía en función de diversos factores. En el segundo trabajo de la presente tesis, encontramos, en concordancia con datos previos publicados, que uno de los factores de riesgo de progresión más importantes es, de nuevo, el genotipo viral

A día de hoy, no disponemos de protocolos específicos de seguimiento y estratificación de riesgo de progresión a HSIL/CIN2+ de las mujeres con infección VPH. El estudio con el mayor tiempo de seguimiento, que son 10 años, publicado hasta ahora sugiere un riesgo acumulado de progresión a HSIL/CIN2 de 20,7% para mujeres VPH16-positivas, 17,7% para mujeres VPH18-positivas y de sólo un 3% para mujeres con infecciones por otros

genotipos de alto riesgo oncogénico⁷⁷. Estas diferencias entre los genotipos 16 y 18 y los demás genotipos de alto riesgo han sido observadas incluso en mujeres con citologías negativas^{104,119}. Los resultados obtenidos en el segundo trabajo de la tesis muestran un significativo mayor porcentaje de infecciones por VPH 16 y/o 18 entre aquellas mujeres en las que la infección persistió al final del periodo de seguimiento y también entre las que progresaron a HSIL/CIN2+. Sin embargo, en el grupo de mujeres que aclararon la infección este porcentaje se invierte, es decir, es menor el porcentaje de infecciones por VPH 16 y/o 18. Además, después de realizar el análisis multivariante, el genotipado VPH 16/18 fue el único factor de entre los estudiados que mostró ser un factor independiente de riesgo de progresión a HSIL/CIN2+.

En cuanto al segundo marcador estudiado, la tinción dual p16/Ki67, aunque también encontramos un mayor porcentaje de tinciones positivas en el grupo de mujeres con persistencia de infección y menor porcentaje en el grupo que aclaró la infección, estas diferencias no fueron significativas. De hecho, observamos el mismo porcentaje de tinciones positivas y negativas en el grupo de mujeres que progresaron a HSIL/CIN2+. Por tanto, la tinción dual parece no aportar ninguna información en cuanto al riesgo de progresión a HSIL/CIN2+. Actualmente en la literatura únicamente hay un estudio que estima la incidencia acumulada a los 5 años de HSIL/CIN2+ en mujeres con infección VPH y citología negativa con tinción dual positiva, siendo del 23% con respecto al 5% de las mujeres que presentan tinción dual negativa¹²³. Sin embargo, en nuestro estudio la tinción positiva no fue identificada como factor de riesgo de progresión a HSIL/CIN2+. Posiblemente diferencias en el diseño

estén detrás de esta discordancia de resultados. En nuestro trabajo se seleccionaron mujeres con prueba VPH-AR positiva y citología negativa procedentes de programas de cribado por alteración de alguna prueba de cribado (citología o prueba VPH-AR). Pero además, se seleccionaron sólo aquellas mujeres en las que se descartó de forma muy precisa, con estudio colposcópico, biopsias dirigidas e incluso biopsias *at random* de la zona de transformación en las mujeres sin lesiones aparente, una lesión de alto grado o invasora subyacente. Sin embargo en el estudio previamente citado, las mujeres fueron remitidas a colposcopia una vez pasados 12 o 24 meses si las citologías de control estaban alteradas. Por tanto, es probable que alguna de esas mujeres ya presentaran una lesión de alto grado antes de ser referida a colposcopia.

Del resto de factores estudiados en nuestro segundo trabajo, únicamente encontramos la citología de referencia de HSIL como factor de riesgo de progresión a HSIL/CIN2+, pero al ajustarlo por el genotipado VPH 16/18 esta asociación se pierde. Además, a pesar de que la media de edad era significativamente mayor en el grupo de mujeres con persistencia viral y progresión, esta variable no se identificó finalmente como factor de riesgo de progresión a HSIL/CIN2+.

Especial interés tiene la colposcopia, ya que ni siquiera el patrón colposcópico del momento del diagnóstico de la lesión de HSIL/CIN2+ durante el seguimiento estaba alterado en la mayoría de mujeres y, además, de los patrones alterados en el momento del diagnóstico, sólo uno fue *de novo*, es decir, la mayoría ya lo estaban en la colposcopia inicial sin haber lesión de alto grado o invasora. Por tanto, la mayoría de HSIL/CIN2+ no eran

evidentes en el estudio colposcópico. A día de hoy, este procedimiento sigue siendo considerado el *gold standard* para guiar las biopsias en mujeres con alto riesgo de presentar HSIL/CIN2+. Sin embargo, disponemos de trabajos publicados que sugieren que las biopsias *at random* de la zona de transformación pueden identificar lesiones de alto grado no visibles en mujeres de riesgo de lesión de alto grado. De hecho, ya importantes sociedades científicas recomiendan en sus guías realizar estas biopsias en mujeres con citologías de alto grado y/o infección por VPH 16 y/o 18^{63,65,124,125}, algo que está en concordancia con los resultados del segundo estudio de la tesis, en el que vemos que muchos HSIL/CIN2+ no se hubieran identificado si no se hubieran llevado a cabo las biopsias *at random*.

En nuestra población de estudio, un importante porcentaje de mujeres (31,2%) había tenido una citología de alto grado en los seis meses previos a la derivación, lo que puede hacer pensar que ya en la primera visita en la Unidad había un HSIL/CIN2+ oculto y que además no fue identificado. Sin embargo, la posibilidad de que no hayamos sido capaces de detectar estas hipotéticas lesiones en la primera visita es bajísima, ya que disponemos de un protocolo de estudio muy bien estructurado con colposcopia, biopsias dirigidas, biopsias *at random* en los casos en que obtuviéramos menos de 4 biopsias dirigidas e incluso legrado endocervical en casos en los que la zona de transformación no fuese visible en su totalidad, además de seleccionar sólo a aquellas pacientes con una citología negativa en la primera visita. Además, el período de progresión, con una mediana de 18,5 meses, es largo para hacer pensar en una falta de detección HSIL/CIN2+, ya que además los controles se hicieron de forma semestral. Por tanto, parece que la citología

de HSIL tiene un papel pronóstico en el seguimiento de pacientes con prueba VPH, pero parece que el genotipado VPH 16/18 es capaz de estratificar mejor el riesgo de progresión a HSIL/CIN2+.

La principal limitación de este segundo estudio es la cantidad relativamente pequeña de mujeres incluidas, lo que puede haber resultado en un número muy pequeño de mujeres que progresaron a HSIL/CIN2 +. Sin embargo, el porcentaje de mujeres que muestran progresión concuerda con lo observado en estudios previos^{63,65,126}. Con el fin de ser lo más precisos posible para excluir posibles HSIL/CIN2 + subyacentes, sólo incluimos las mujeres con citología negativa en la primera visita, y se excluyeron aquellas con anomalías leves citológicas en la visita inicial. Se ha demostrado que se pueden encontrar HSIL/CIN2+ en hasta el 16% de las mujeres con infección por VPH-AR y anormalidades citológicamente leves⁸⁰. No se consideró un criterio de exclusión un patrón colposcópico anormal porque se realizó una evaluación histológica precisa de todos los patrones anormales, biopsias *at random* de áreas no sugestivas de HSIL/CIN2 + y evaluación endocervical en todos los casos en los que la zona de transformación no pudo evaluarse adecuadamente.

De acuerdo con estos resultados, la conclusión principal de nuestro segundo trabajo es que parece razonable utilizar el genotipado VPH 16/18, más que la tinción dual y la citología de referencia, en las unidades especializadas para la estratificación del riesgo de pacientes sin lesión de alto grado y prueba VPH-AR positiva. Las mujeres con infección por los genotipos 16 y/o 18 se podrían beneficiar de un seguimiento más estricto que pueda identificar de forma precoz lesiones transformantes y tratarlas en función de

las recomendaciones de las guías clínicas^{79,80,118}. Además, en el estudio de estas mujeres, se deben considerar la realización de biopsias *at random* de la zona de transformación y/o legrado endocervical por el elevado riesgo de desarrollar una lesión de alto grado o invasora no siempre visible en el estudio colposcópico.

VI. CONCLUSIONES

1. Las pruebas de detección de VPH (HC2, Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2), presentan una alta concordancia para la detección de la infección VPH.
2. Las pruebas que informan sobre el genotipado (Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) demuestran una elevada concordancia en la detección de los diferentes genotipos virales.
3. Las pruebas de detección VPH (Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) presentan una sensibilidad clínica y especificidad equiparables para el diagnóstico de HSIL/CIN2+.
4. En los casos con determinación positiva para VPH 16/18 las pruebas de genotipado analizadas (Anyplex, Linear Array, GP5+/6+ y CLART2) son equiparables en sensibilidad clínica y especificidad para el diagnóstico de HSIL/CIN2+.
5. Las mujeres con infección por VPH 16 y/o 18, en las que se ha descartado adecuadamente un HSIL/CIN2+ subyacente, tienen un riesgo mayor de persistencia viral y progresión a HSIL/CIN2+ con respecto a las mujeres con infección por otros genotipos de alto riesgo.
6. Las mujeres que presentan una citología con tinción dual p16/Ki67 positiva, en las que se ha descartado adecuadamente un HSIL/CIN2+ subyacente, no presentan un riesgo mayor de persistencia viral y

progresión a HSIL/CIN2+ respecto a las que presentan citología con tinción dual negativa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-86, 2015
2. Kurman RJ, Shih Ie M: Discovery of a cell: reflections on the checkered history of intermediate trophoblast and update on its nature and pathologic manifestations. *Int J Gynecol Pathol* 33:339-47, 2014
3. Reagan JW, Hamonic MJ: Dysplasia of the uterine cervix. *Ann N Y Acad Sci* 63:1236-44, 1956
4. Richart RM, Sciarra JJ: Treatment of cervical dysplasia by outpatient electrocauterization. *Am J Obstet Gynecol* 101:200-5, 1968
5. Richart RM: Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8:301-28, 1973
6. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, et al: The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 136:1266-97, 2012
7. Groves IJ, Coleman N: Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol* 235:527-38, 2015
8. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, et al: Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13:650-6, 1974
9. zur Hausen H: Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 36:794, 1976
10. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9, 1999
11. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802, 1995
12. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55:244-65, 2002

13. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, et al: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-4, 1985
14. Qi YM, Peng SW, Hengst K, et al: Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein. *Virology* 216:35-45, 1996
15. Parkin DM: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-44, 2006
16. Galloway DA: Papillomavirus vaccines in clinical trials. *Lancet Infect Dis* 3:469-75, 2003
17. Woodman CB, Collins SI, Young LS: The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7:11-22, 2007
18. Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, et al: HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* 115:419-28, 2005
19. Peter M, Rosty C, Couturier J, et al: MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 25:5985-93, 2006
20. Ferenczy A, Franco E: Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 3:11-6, 2002
21. Castle PE, Fetterman B, Poitras N, et al: Five-year experience of human papillomavirus DNA and Papanicolaou test cotesting. *Obstet Gynecol* 113:595-600, 2009
22. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, et al: Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 354:2645-54, 2006
23. Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, et al: Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/52-61, 2006
24. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM: The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS* 118:422-49, 2010

25. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, et al: Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 95:2145-51, 2002
26. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, et al: Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 364:1678-83, 2004
27. Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, et al: Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet* 358:1782-3, 2001
28. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, et al: Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106:396-403, 2003
29. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, et al: Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907, 2007
30. Tringler B, Gup CJ, Singh M, et al: Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol* 35:689-96, 2004
31. Munger K, Basile JR, Duensing S, et al: Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20:7888-98, 2001
32. Naucler P, Ryd W, Tornberg S, et al: Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 357:1589-97, 2007
33. Bulkmand NW, Berkhof J, Rozendaal L, et al: Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet* 370:1764-72, 2007
34. Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, et al: HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 10:672-82, 2009
35. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, et al: A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *Br J Cancer* 83:561-5, 2000

36. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, et al: Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ* 337:a1754, 2008
37. Katki HA, Kinney WK, Fetterman B, et al: Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 12:663-72, 2011
38. Kotaniemi-Talonen L, Anttila A, Malila N, et al: Screening with a primary human papillomavirus test does not increase detection of cervical cancer and intraepithelial neoplasia 3. *Eur J Cancer* 44:565-71, 2008
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* 26 Suppl 10:K29-41, 2008
40. Bray F, Carstensen B, Moller H, et al: Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2191-9, 2005
41. Torne A, Ordi J, Puig-Tintore LM, et al: [The detection of papillomavirus by in situ hybridization. Clinico-pathological and virological correlation in patients with squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix]. *Med Clin (Barc)* 109:691-5, 1997
42. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K: Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 15:727-46, 2005
43. 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* 124:516-20, 2009
44. Ramirez-Hidalgo A, Musset-Biarnes M, Vilamala-Muns M, et al: Hybrid capture 2 high-risk human papillomavirus test: should "grey zone" results justify repeating the test? *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 35:152-6, 2013
45. Herraiz-Hernandez E, Preda O, Alonso S, et al: Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens with the HPV Direct Flow CHIP System. *Open Virol J* 7:91-5, 2013

46. Heideman DA, Hesselink AT, van Kemenade FJ, et al: The Aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *J Clin Microbiol* 51:3653-7, 2013
47. Castle PE, Reid J, Dockter J, et al: The reliability of high-risk human papillomavirus detection by Aptima HPV assay in women with ASC-US cytology. *J Clin Virol* 69:52-5, 2015
48. Giorgi Rossi P, Benevolo M, Vocaturo A, et al: Prognostic value of HPV E6/E7 mRNA assay in women with negative colposcopy or CIN1 histology result: a follow-up study. *PLoS One* 8:e57600, 2013
49. Discacciati MG, da Silva ID, Villa LL, et al: Prognostic value of DNA and mRNA e6/e7 of human papillomavirus in the evolution of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Biomark Insights* 9:15-22, 2014
50. Persson M, Brismar Wendel S, Ljungblad L, et al: High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA and L1 DNA as markers of residual/recurrent cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol Rep* 28:346-52, 2012
51. Fedewa SA, Sauer AG, Siegel RL, et al: Prevalence of major risk factors and use of screening tests for cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24:637-52, 2015
52. Castle PE, Bulten J, Confortini M, et al: Age-specific patterns of unsatisfactory results for conventional Pap smears and liquid-based cytology: data from two randomised clinical trials. *BJOG* 117:1067-73, 2010
53. Koss LG: Cytology. Accuracy of diagnosis. *Cancer* 64:249-52; discussion 253-7, 1989
54. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al: Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 30 Suppl 5:F88-99, 2012
55. van der Graaf Y, Vooijs GP, Gaillard HL, et al: Screening errors in cervical cytologic screening. *Acta Cytol* 31:434-8, 1987
56. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, et al: Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 111:167-77, 2008

57. de Bekker-Grob EW, de Kok IM, Bulten J, et al: Liquid-based cervical cytology using ThinPrep technology: weighing the pros and cons in a cost-effectiveness analysis. *Cancer Causes Control* 23:1323-31, 2012
58. Karnon J, Peters J, Platt J, et al: Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 8:iii, 1-78, 2004
59. Tambouret RH: The evolution of the Papanicolaou smear. *Clin Obstet Gynecol* 56:3-9, 2013
60. Davies KR, Cantor SB, Cox DD, et al: An alternative approach for estimating the accuracy of colposcopy in detecting cervical precancer. *PLoS One* 10:e0126573, 2015
61. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, et al: Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 91:626-31, 1998
62. Bornstein J, Bentley J, Bosze P, et al: 2011 colposcopic terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy. *Obstet Gynecol* 120:166-72, 2012
63. van der Marel J, van Baars R, Rodriguez A, et al: The increased detection of cervical intraepithelial neoplasia when using a second biopsy at colposcopy. *Gynecol Oncol* 135:201-7, 2014
64. Gage JC, Hanson VW, Abbey K, et al: Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. *Obstet Gynecol* 108:264-72, 2006
65. Wentzensen N, Schiffman M, Silver MI, et al: ASCCP Colposcopy Standards: Risk-Based Colposcopy Practice. *J Low Genit Tract Dis* 21:230-234, 2017
66. Luesley D, Leeson S: Colposcopy and programme management : guidelines for the NHS cervical screening programme (ed 2nd ed.). Sheffield, NHS Cancer Screening Programme, 2010
67. Barut MU, Kale A, Kuyumcuoglu U, et al: Analysis of Sensitivity, Specificity, and Positive and Negative Predictive Values of Smear and Colposcopy in Diagnosis of Premalignant and Malignant Cervical Lesions. *Med Sci Monit* 21:3860-7, 2015

68. Cox JT, Schiffman M, Solomon D, et al: Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 188:1406-12, 2003
69. Castle PE, Sideri M, Jeronimo J, et al: Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 197:356 e1-6, 2007
70. Vercellino GF, Erdemoglu E: What should be the goal for future development of colposcopy? Cons and pros of sensitivity and specificity. *Arch Gynecol Obstet* 291:713-4, 2015
71. Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al: Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol* 97:35-40, 2005
72. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al: p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 26:1389-99, 2002
73. Parker MF, Zahn CM, Vogel KM, et al: Discrepancy in the interpretation of cervical histology by gynecologic pathologists. *Obstet Gynecol* 100:277-80, 2002
74. Al-Nourhji O, Beckmann MJ, Markwell SJ, et al: Pathology correlates of a Papanicolaou diagnosis of low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer* 114:469-73, 2008
75. Schiffman M, Glass AG, Wentzensen N, et al: A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1398-409, 2011
76. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al: Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11:1048-56, 2010
77. 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* 97:1072-9, 2005

78. Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, et al: Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 191:731-8, 2005

79. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, et al: 2012 updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening tests and cancer precursors. *J Low Genit Tract Dis* 17:S1-S27, 2013

80. Torné A; Del Pino M CM, Alameda F, Andia D, Castellsagué X, et al.: Guía de cribado del cáncer de cuello de útero en España, 2014. *Prog Obstet Ginecol*. 57(Supl. 1):1-53, 2014

81. Jeronimo J, Castle PE, Temin S, et al: Secondary Prevention of Cervical Cancer: American Society of Clinical Oncology Resource-Stratified Clinical Practice Guideline Summary. *J Oncol Pract* 13:129-133, 2017

82. Broccolo F, Fusetti L, Rosini S, et al: Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: results from a multicenter study. *J Med Virol* 85:472-82, 2013

83. Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, et al: HPV mRNA is more specific than HPV DNA in triage of women with minor cervical lesions. *PLoS One* 9:e112934, 2014

84. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, et al: Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 133:395-406, 2010

85. Ordi J, Garcia S, del Pino M, et al: p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol* 28:90-7, 2009

86. del Pino M, Garcia S, Fuste V, et al: Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* 201:488 e1-7, 2009

87. Sagasta A, Castillo P, Saco A, et al: p16 staining has limited value in predicting the outcome of histological low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Mod Pathol* 29:51-9, 2016

88. Ordi J, Sagasta A, Munmany M, et al: Usefulness of p16/Ki67 immunostaining in the triage of women referred to colposcopy. *Cancer Cytopathol* 122:227-35, 2014
89. Branca M, Giorgi C, Santini D, et al: Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 124:113-21, 2005
90. Gupta N, Srinivasan R, Rajwanshi A: Functional biomarkers in cervical precancer: an overview. *Diagn Cytopathol* 38:618-23, 2010
91. Del Pino M, Svanholm-Barrie C, Torne A, et al: mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer. *Mod Pathol* 28:312-20, 2015
92. Sanati S, Huettner P, Ylagan LR: Role of ProExC: a novel immunoperoxidase marker in the evaluation of dysplastic squamous and glandular lesions in cervical specimens. *Int J Gynecol Pathol* 29:79-87, 2010
93. Yoshida H, Sumi T, Hyun Y, et al: Expression of survivin and matrix metalloproteinases in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Oncol Rep* 10:45-9, 2003
94. Esteller M, Fraga MF, Paz MF, et al: Cancer epigenetics and methylation. *Science* 297:1807-8; discussion 1807-8, 2002
95. Hesselink AT, Heideman DA, Steenbergen RD, et al: Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: an objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *Clin Cancer Res* 17:2459-65, 2011
96. Lorincz AT: Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. *Acta Cytol* 60:501-512, 2016
97. Jordan J, Martin-Hirsch P, Arbyn M, et al: European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2. *Cytopathology* 20:5-16, 2009
98. Schiller JT, Castellsague X, Garland SM: A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine* 30 Suppl 5:F123-38, 2012

99. Serrano B, de Sanjose S, Tous S, et al: Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *Eur J Cancer* 51:1732-41, 2015
100. Bruni L, Serrano B, Bosch X, et al: [Human papillomavirus vaccine. Efficacy and safety]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 33:342-54, 2015
101. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, et al: A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 372:711-23, 2015
102. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119:1095-101, 2006
103. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, et al: Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383:524-32, 2014
104. Thomsen LT, Frederiksen K, Munk C, et al: Long-term risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse according to high-risk human papillomavirus genotype and semi-quantitative viral load among 33,288 women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 137:193-203, 2015
105. Kwon MJ, Roh KH, Park H, et al: Comparison of the Anyplex II HPV28 assay with the Hybrid Capture 2 assay for the detection of HPV infection. *J Clin Virol* 59:246-9, 2014
106. Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, et al: Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virol* 46 Suppl 3:S1-4, 2009
107. Ejegod DM, Rebolj M, Bonde J: Comparison of analytical and clinical performance of CLART HPV2 genotyping assay to Linear Array and Hybrid Capture 2: a split-sample study. *BMC Cancer* 15:216, 2015
108. Bouchard-Fortier G, Paszat L, Murphy KJ: Management of abnormal cervical cytology screening in adolescent and young women in a canadian colposcopy centre: a descriptive analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 35:149-55, 2013
109. Chranioti A, Spathis A, Aga E, et al: Comparison of two commercially available methods for HPV genotyping: CLART HPV2 and Linear Array HPV Genotyping tests. *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 34:257-63, 2012

110. Comar M, Iannacone MR, Casalicchio G, et al: Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *J Clin Microbiol* 50:4041-6, 2012
111. Cornall AM, Poljak M, Garland SM, et al: Anyplex II HPV28 detection and Anyplex II HPV HR detection assays are highly concordant with other commercial assays for detection of high-risk HPV genotypes in women with high grade cervical abnormalities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:545-551, 2017
112. Latsuzbaia A, Tapp J, Nguyen T, et al: Analytical performance evaluation of Anyplex II HPV28 and Euroarray HPV for genotyping of cervical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85:318-322, 2016
113. Lim YK, Choi JH, Park S, et al: Comparison of Three Different Commercial Kits for the Human Papilloma Virus Genotyping. *J Clin Lab Anal* 30:1110-1115, 2016
114. Lillsunde Larsson G, Carlsson J, Karlsson MG, et al: Evaluation of HPV Genotyping Assays for Archival Clinical Samples. *J Mol Diagn* 17:293-301, 2015
115. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, et al: Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 57:68-72, 2004
116. van der Marel J, Berkhof J, Ordi J, et al: Attributing oncogenic human papillomavirus genotypes to high-grade cervical neoplasia: which type causes the lesion? *Am J Surg Pathol* 39:496-504, 2015
117. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, et al: Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer* 125:2151-8, 2009
118. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, et al: 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis* 11:201-22, 2007

119. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, et al: Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol* 136:189-97, 2015
120. Ebisch RM, de Kuyper-de Ridder GM, Bosgraaf RP, et al: The clinical value of HPV genotyping in triage of women with high-risk-HPV-positive self-samples. *Int J Cancer* 139:691-9, 2016
121. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T, et al: Primary screening for cervical cancer based on high-risk human papillomavirus (HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology. *PLoS One* 10:e0119755, 2015
122. Katki HA, Schiffman M, Castle PE, et al: Five-year risks of CIN 3+ and cervical cancer among women who test Pap-negative but are HPV-positive. *J Low Genit Tract Dis* 17:S56-63, 2013
123. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, et al: Triage of HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer* 136:2361-8, 2015
124. Nam K, Chung S, Kwak J, et al: Random biopsy after colposcopy-directed biopsy improves the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse. *J Low Genit Tract Dis* 14:346-51, 2010
125. Massad LS, Collins YC: Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Oncol* 89:424-8, 2003
126. van der Marel J, Rodriguez A, Del Pino M, et al: The Value of Endocervical Curettage in Addition to Biopsies in Women Referred to Colposcopy. *J Low Genit Tract Dis* 19:282-7, 2015