

Comparación de la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIAe INNO-LiPA para la detección de genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano en Cochabamba, Bolivia

Comparison of PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} - EIA and INNO-LiPA for the detection of high-risk genotypes of human papillomavirus in Cochabamba, Bolivia

Maria Isabel Garcia-Sejas^{1,a}, Tania Vargas^{1,b}, Karina Ustariz^{1,c}, Shirley Rojas^{1,d},
Rosse Mary Yañez^{1,e}, Patricia Rodríguez^{1,f}

Resumen

El principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer cervical es la infección persistente con genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH-AR). Muchos métodos para la detección de VPH-AR están disponibles comercialmente, y su uso como método de tamizaje está contribuyendo a la disminución de la incidencia de cáncer de cuello uterino en varios países. **Objetivo:** el propósito de este trabajo fue evaluar la eficacia de la PCR con cebadores GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA, comparándola con la técnica de INNO-LiPA, utilizada como estándar de oro para la detección de infecciones por VPH-AR, en especial VPH 16/18. **Métodos:** se analizaron en paralelo 98 muestras cervicales positivas para PCR PGMY09/11 o PCR anidada GP5/6, mediante PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} seguida de un inmunoensayo (EIA) y por PCR SPF10 seguida de una hibridación reversa (INNO-LiPA). El nivel de concordancia se determinó con el valor Kappa de Cohen. **Resultados:** en el análisis de concordancia para detectar VPH-AR valores de Kappa para INNO-LiPA y PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA en multi-infecciones y mono-infecciones fueron de 0,3 (95 % IC, 0,11-0,44) y 0,6 (95 % IC, 0,32-0,89) respectivamente. En general, la concordancia para detectar VPH-AR 16/18 entre ambos métodos fue moderada, con un Kappa de 0,5 (95 % IC, 0,34-0,67) y 0,7 (95 % IC, 0,48-0,95) en mono-infecciones (VPH 16 o 18). **Conclusiones:** los hallazgos de comparación entre la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA y la técnica INNO-LiPA muestran de pobre a moderada concordancia para la detección de VPH-AR y de moderada a buena, para la detección de VPH 16 o 18.

Palabras claves: virus del papiloma humano, neoplasias del cuello uterino, PCR, EIA, INNO-LiPA, genotipado de VPH

Abstract

The main risk factor for the development of cervical cancer is persistent infection with high-risk genotypes of the human papillomavirus (HR-HPV). Many methods for the detection of HR-HPV are commercially available and their use as a screening method is contributing to the decrease in the incidence of cervical cancer in several countries. **Objective:** The purpose of this work was to evaluate the efficacy of PCR with GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA primers, comparing it with the INNO-LiPA technique that was used as a gold standard for the detection of infections by HR-HPV, especially HPV 16/18. **Methods:** Ninety-eight cervical samples positive for PCR PGMY09 / 11 or nested PCR GP5/6, were analyzed concurrently using PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} followed by an immunoassay (EIA) and PCR SPF10 followed by a reverse hybridization (INNO-LiPA). The level of agreement was determined using Cohen's Kappa value. **Results:** in the concordance analysis for detecting HR-HPV, the Kappa values for INNO-LiPA and PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA in multi-infections and mono-infections were 0,3 (95 % CI; 0,10-0,44) and 0,6 (95 % CI; 0,32-0,89) respectively. In general, the concordance to detect HR-HPV 16/18 between both methods is moderate 0,5 (95 % CI; 0,34-0,67) and 0,7 (95 % CI; 0,48-0,95) in mono-infections (HPV 16 or 18). **Conclusions:** The findings of comparison between the PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA and the INNO-LiPA technique show poor to moderate agreement for the detection of HR-HPV and moderate to good agreement for the detection of HPV 16 or 18.

Keywords: human papillomavirus, uterine cervical neoplasms, PCR, EIA, INNO-LiPA, HPV genotyping

Recibido el
11 de enero de 2024

Aceptado
20 de junio de 2024

¹Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

^a<https://orcid.org/0000-0002-6092-2643>

^b<https://orcid.org/0009-0004-1362-7811>
tani.varg@gmail.com

^c<https://orcid.org/0000-0003-1566-657X>
karinaustariz@hotmail.com

^d<https://orcid.org/0000-0001-7638-5304>
shirley.rojas@gmail.com

^e<https://orcid.org/0000-0002-9876-2833>
rosseya@hotmail.com

^f<https://orcid.org/0000-0002-5641-9113>
patriciarohe@gmail.com

*Correspondencia:

Maria Isabel Garcia-Sejas

Correo electrónico:
mi.garcia.sejas@gmail.com

DOI:

<https://doi.org/10.47993/gmbv47i2.818>

El cáncer cervical es un importante problema de salud a nivel mundial y es considerado el tercer tipo de cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo, con un estimado de 569 847 nuevos casos y 311 365 muertes en 2018¹. Bolivia tiene una de las tasas de incidencia (38,5) y mortalidad (19,0) más elevadas en Latinoamérica, siendo la primera causa de cáncer en mujeres en nuestro país. Se han diagnosticado 1 949 nuevos casos de cáncer cervical y se ha reportado 1 022 muertes por esta enfermedad para el 2018².

El principal factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad es la infección persistente por genotipos del Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR)³, 99,7 % de los casos de cáncer cervical se deben a VPH-AR⁴.

De acuerdo con la secuencia de su genoma, se han descrito aproximadamente 189 tipos de VPH, de los cuales 120 tipos se han aislado en humanos⁵. Los VPH se clasifican: según su tropismo tisular en cinco géneros principales (alfa, beta, gamma, nu y mu) de los cuales los virus del papiloma alfa (alfa-VPH) infectan los tejidos de la mucosa, mientras que los otros subgrupos restantes infectan sitios cutáneos⁶. De acuerdo a la capacidad oncogénica, los VPH son de riesgo bajo, intermedio y alto⁷. Los VPH de bajo riesgo, que incluyen los VPH 6, 11, 42, 43 y 44, pueden causar lesiones cervicales benignas^{7,8}. Los VPH de riesgo intermedio involucra al VPH 26, 53, 68, 73 y 6⁸⁹ y los VPH de alto riesgo incluyen el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 causan transformaciones neoplásicas⁹⁻¹¹.

Si bien el cribado del cáncer cervical con citología (test de Papanicolau) ha contribuido a reducir las tasas de incidencia y mortalidad, se ha mostrado que el cribado basado en la detección del VPH aporta una sensibilidad superior a la citología, por lo que se hace cada vez más necesaria su inclusión al diagnóstico¹²⁻¹⁴.

En la actualidad muchos métodos moleculares han sido desarrollados para detectar los principales genotipos de VPH-AR y la mayoría son pruebas comerciales. Entre los métodos de detección directa del genoma está el método de captura de híbridos (Hybrid Capture® 2) de Qiagen, pero, los más empleados son los métodos de amplificación del DNA viral por PCR como, Cobas® 4800 de Roche y la PCR en tiempo real de Abbott entre otros. Todos estos métodos están validados clínicamente para su uso en el cribado primario. Por otro lado, existen métodos que permiten identificar individualmente genotipos de alto y bajo riesgo de VPH mediante hibridación reversa después de una amplificación genérica, como el método INNO-LiPA de Innogenetics¹⁵. Todos estos métodos de alta fiabilidad tienen un elevado costo que dificulta su implementación en países con bajos recursos.

Este estudio describe el proceso de implementación de la PCR - GP5+/GP6⁺_{BIO} - EIA, que resulta de la combinación de una técnica molecular, la PCR y una técnica inmunoenzimática (Enzimo Inmuno Ensayo), la EIA, con el beneficio de su relativo bajo costo.

Los partidores o cebadores de esta PCR amplifican un fragmento de la región L1 del VPH permitiendo la detección de 37 tipos virales: 14 VPH-AR y 23 VPH de bajo riesgo (VPH-BR). Los productos de PCR amplificados en la primera etapa pueden ser hibridados con oligonucleótidos específicos de los genotipos de VPH de interés. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la capacidad de detección de los diferentes genotipos de VPH-AR y VPH 16 y 18 de la PCR GP5+/GP6⁺_{BIO} - EIA comparandola con la técnica comercial de genotipado de hibridación reversa INNO-LiPA *Genotyping* Extra (Innogenetics NV, Ghent, Bélgica).

Materiales y métodos

Población de estudio y recolección de muestras cervicales

En este estudio se emplearon 98 muestras de células cervicales conservadas en solución Easy Fix. Estas fueron tomadas del banco de muestras del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Todas estas muestras contaban con un resultado positivo para β -globina y eran positivas para VPH mediante PCR PGMY09/11 o PCR anidada (nPCR GP5/6). Las muestras fueron obtenidas de mujeres de entre 18 y 65 años que acudieron al servicio ginecológico del Hospital Materno Infantil Germán Urquidí (HMIGU) en la ciudad de Cochabamba, Bolivia. Todas las participantes firmaron un consentimiento informado.

Preparación de ADN a partir de muestras conservadas

La extracción de ADN celular se realizó por el método de congelación-descongelación descrito por Fontaine et al.¹⁵. La calidad del ADN extraído fue verificada mediante la amplificación del gen de la β -globina humana con los siguientes cebadores GH20 (5'- GAAGAG CCAAGG ACAGGTAC - 3') y PCO4 (5'- CAACTTCATCCACGT TCACC - 3') que amplifican un fragmento de 268 pares de bases (pb)¹⁶. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.) después de una incubación en una solución de bromuro de etidio 0,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich).

PCR PGMY09/11

Las muestras fueron nuevamente analizadas para la detección del ADN viral de VPH utilizando el mix de cebadores PGMY09/11, que amplifica un fragmento de 450 pb de la región conservada del gen L1, los cuales permiten identificar más de 30 tipos de VPH genitales¹⁷. La mezcla de reacción de PCR contenía 4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 μ M del mix de cebadores, 1,25 U de GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega, EE. UU.). El volumen de reacción total fue de 25 μ l con 5 μ l de extracto de ADN crudo. La PCR se realizó en un termociclador T100™ (Bio-Rad, EE.UU.) siguiendo el protocolo de amplificación descrito por Fontaine et al.¹⁵. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.) después de una incubación en una solución de bromuro de etidio 0,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich).

Tabla 1. Detección de VPH mediante INNO-LiPA y PCR-EIA

Método	Genotipos		
	Alto	Intermedio	Bajo
INNO - LiPA	16,18,31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,68,73,82	26,53,66,40,54, 69,70,71,74	6,11,42,44
PCR - EIA	16,18,31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,68,73,82		

Identificación de VPH-AR y VPH16/18 por PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} - EIA

Para la detección de los VPH-AR se utilizó los cebadores específicos GP5+, 5'- TTT GTTACT GTG GTA GAT ACT AC-3' y GP6⁺_{BIO}, 5'- GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATTC 3'. Estos cebadores amplifican un fragmento de 150 pb de la región L1 del genoma del VPH¹⁸ incluidos los VPH -AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68)¹⁹. La mezcla de reacción de PCR contiene 3,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los dNTP, 1,0 μM de los cebadores, 1,25 U de GoTaq[®] G2 Hot Start polimerasa (Promega, EE.UU.). El volumen total de reacción fue de 50 ul con 10 μl de ADN. La PCR se realizó en un termociclador T100™ (Bio-Rad, EE. UU.) siguiendo el protocolo de la PCR descrito por Fontaine et al.¹⁵. Los fragmentos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.) después de una incubación en una solución de bromuro de etidio 0,5 μg/ ml (Sigma-Aldrich).

Enzimo Inmuno ensayo (EIA)

Para la identificación de los principales VPH-AR se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) descrita por Jacobs et al.^{19,20}. Brevemente, el producto de la PCR GP5⁺/GP6⁺ biotinilados fueron capturados en micropocillos recubiertos con estreptavidina (Greiner-Bio One). Para la detección e identificación de 15 genotipos VPH-AR, se utilizaron dos cocteles de oligonucleótidos: cóctel 1 con oligonucleótidos que hibridan VPH 16/18 y cóctel 2 que reconocen VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 detallados en la Tabla 1.

La visualización de bandas se realizó con la ayuda de un espectrofotómetro obteniendo lecturas de densidad óptica (DO) a 405nm, el punto de corte fue, el promedio de las DOs de los controles negativos más tres desviaciones estándar como recomienda Moller et al.²¹.

Detección de VPH con la técnica INNO-LiPA.

La detección e identificación de VPH - AR por la prueba INNO-LiPA (Innogenetics NV, Ghent, Bélgica) se realizó siguiendo las recomendaciones del proveedor con algunas modificaciones¹⁵. Brevemente, primero se realizó la PCR SPF10 que detecta secuencias específicas (65 pb) en la región L1 del genoma de VPH e identifica 28 diferentes genotipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82, 26, 53,66, 6, 11, 40, 43, 44, 54, 69, 70, 71 y 74)²² como se detalla en la Tabla 1. La amplificación del ADN viral se llevó a cabo en un termociclador T100™ (Bio-Rad, EE.UU.). La presencia de productos amplificados se confirmó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, teñida con bromuro de etidio. Los pasos de hibridación se realizaron poniendo en contacto el producto de amplificación sobre tiras de nitrocelulosa siguiendo los procedimientos indicados en el protocolo del fabricante.

Tabla 2. Comparación de los Resultados de Detección de VPH-AR, INNO-LiPA vs PCR-EIA

INNO - LiPA	General *		Total	Mono-Infeción		Total
	PCR-EIA			PCR-EIA		
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Positivo	55	28	83	21	4	25
Negativo	3	12	15	2	8	10
Total	58	40	98	23	12	35
Kappa (CI 95%)	0,3 (0,11 - 0,44)			0,6 (0,32 - 0,89)		

*Población general que incluye multi-infecciones y mono-infecciones

El análisis estadístico

El estudio de concordancia entre los diferentes métodos de detección se realizó con el coeficiente de Kappa de Cohen. En general, los valores de Kappa se valora de <0,20 a 1,00, donde 0,20 a 0,4 se considera un acuerdo regular, de 0,4 a 0,6 moderado, de 0,6 a 0,8 bueno y de 0,8 a 1,00 muy bueno²³. Para la comparación de proporciones de resultados positivos se utilizó la prueba de McNemar. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics (versión 25).

Resultados

Detección de VPH-AR por la técnica PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA.

Como se describe en la tabla 2, de las 98 muestras analizadas, la técnica de INNO-LiPA detectó uno o más genotipos de VPH-AR en 84,7 % (83/98) de las muestras. En el resto (12,2 %), se detectó casos con genotipos de bajo riesgo e intermedio. En 2 muestras no se detectó ADN viral y en una muestra no se identificó ningún genotipo. La técnica de PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA, detectó VPH-AR en el 59,2 % (58/98) de las muestras. El índice de concordancia Kappa entre ambas técnicas para detectar VPH-AR fue de 0,3 (95% IC, 0,11 - 0,44), considerado como Regular (Tabla 2 izquierda). Aplicando la prueba de McNemar (p = 0,00), se evidencia que existen diferencias significativas entre las proporciones de muestras positivas de alto riesgo detectadas por ambas pruebas.

La técnica INNO-LiPA evidenció la presencia de múltiples infecciones por VPH de alto riesgo en el 63,2 % (60/95) de la población analizada, donde, el 47,4 % (45/95) presentaba 2 genotipos y el 15,8 % (15/95) presentaba más de 3 genotipos. Solo 35 de las 95 muestras (36,8 %) presentaron mono-infecciones.

Analizando la concordancia entre ambas técnicas para la detección de VPH-AR en muestras con mono y múltiples infecciones, observamos que la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA detectó genotipos de alto riesgo en un 92,0 % (23/25), en muestras discriminadas como mono-infectadas por INNO-LiPA (Tabla 3). En cambio, la capacidad de detectar VPH-AR fue menor (58,6 %) en muestras con múltiples infecciones (34 de 58, datos no mostrados). El índice de concordancia Kappa (Tabla 2 derecha) para detectar VPH-AR entre las dos técnicas en muestras con mono infecciones fue moderada (Kappa = 0,6 (95 % IC, 0,32 - 0,89), el test de McNemar (p = 0,688) indica que no existen diferencias significativas entre ambas proporciones. Los VPH 52 no fueron detectados por la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA, en muestras con mono- infección e incluso si se encontraba coinfectada con genotipos de bajo riesgo o riesgo intermedio (Tabla 4).

Detección de VPH-16/18 por la técnica PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA

Los resultados muestran que la técnica de INNO-LiPA detectó VPH 16 y/o 18 en un 47,9 % (47/98) del total de las muestras. Utilizando el cóctel 1 (que solo detecta VPH 16/18), la técnica PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}-EIA detectó cualquiera de estos genotipos en 39/98 (39,8 %). El índice de Kappa de concordancia entre estas dos técnicas fue Moderada (Kappa = 0,5; 95 % IC, 0,34 -0,67) (Tabla 5 izquierda). Cuando analizamos el índice de Kappa en muestras con mono-infecciones, observamos que la concordancia es buena 0,7 (95 % IC, 0,48 -0,95) (Tabla 5 derecha). La comparación de proporciones medida por el test McNemar muestra que no existen

Tabla 3. Genotipos Detectados por INNO-LiPA vs PCR-EIA en Mono-infecciones

Tipo de VPH	Riesgo	Mono-infección		
		INNO-LiPA	PCR-EIA	
		n	C1*	C2**
16	Alto	16	14	1
18	Alto	1	1	1
31	Alto	0	0	0
33	Alto	0	0	0
35	Alto	0	0	0
39	Alto	0	0	0
45	Alto	2	1	2
51	Alto	2	0	2
52	Alto	2	0	0
53	Intermedio	1	1	
56	Alto	0	0	0
58	Alto	0	0	0
59	Alto	0	0	0
66	Intermedio	7	1	
68	Alto	2	0	2
73	Alto	0	0	0
82	Alto	0	0	0

* Cóctel 1: Oligos 16 y 18

** Cóctel 2: Oligos para 13 genotipos de AR

diferencias significativas (p=1) entre ambos métodos para detectar VPH 16/18.

Basándonos en los genotipos detectados por INNO-LiPA en muestras con mono-infecciones, podemos ver que el cóctel 1 de la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO}- EIA detectó VPH 16 en 14 de las 16 muestras positivas y también detectó el único caso con VPH 18 (Tabla 3). En general, el coctel 1 detectó VPH 16 o 18 en el 88,2 % de las muestras con mono-infecciones. Por otro lado, se puede observar que este mismo cóctel dio reacción cruzada con los genotipos 45, 53 y 66. La capacidad de detectar los genotipos 16/18 del cóctel 1 en muestras con múltiples

Tabla 4. Genotipo VPH 52 Detectado por INNO-LiPA vs PCR-EIA

Tipo de VPH	INNO-LiPA	PCR-EIA	
		C1*	C2**
52	2	0	0
52 + 16/18	6	4	0
52 +AR	26	7	15
52 + IR	3	0	0
52 +BR	2	0	0

* Cóctel 1: Oligos 16 y 18

** Cóctel 2: Oligos 52 + 12 VPH AR

Tabla 5. Comparación de los Resultados de Detección de VPH 16/18 por INNO-LiPA vs PCR-EIA

INNO - LiPA	General *		Total	Mono-Infección		Total
	PCR-EIA			PCR-EIA		
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
Positivo	31	16	47	15	2	17
Negativo	8	43	51	3	15	18
Total	39	59	98	18	17	35
Kappa (CI 95%)	0,5 (0,34 - 0,67)			0,7 (0,48 - 0,95)		

*Población general que incluye multi-infecciones y mono-infecciones

infecciones es significativamente menor (53,3 %).

Discusión

En este estudio, comparamos la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} - EIA “in home” con la técnica “gold standard” INNO-LiPA, que identifica una amplia gama de genotipos de VPH, con el objetivo de evaluar su capacidad de detección de los genotipos VPH 16,18 y otros 13 genotipos de VPH de alto riesgo.

Los valores de concordancia Kappa reflejan una concordancia de moderada a buena para la detección de VPH - AR (Kappa = 0,6), así como para la detección de VPH 16 y /o 18 (Kappa = 0,7) en muestras con mono-infecciones. Sin embargo, la concordancia entre ambos métodos para la detección de VPH-AR fue baja (Kappa = 0,3) cuando se incluye en el análisis muestras con múltiples infecciones (total de las muestras).

Una diferencia fundamental entre ambas técnicas son los cebadores utilizados para la amplificación del ADN viral. La PCR INNO-LiPA se basa en un sistema de cebadores SPF10, que tiene una mayor sensibilidad y robustez para detectar múltiples infecciones. Esto se debe a la alta capacidad de hibridación de los cebadores SPF10 con ADN viral fragmentado, como es el caso en ADN recuperado de tacos biopsias, o en muestras con baja carga viral²⁴, amplificando fragmentos pequeños (65pb) de ADN de VPH²⁵. En cambio, la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} utiliza cebadores que amplifica un fragmento de 150 pb la región L de un amplio espectro de genotipos de VPH genital²⁶, con elevada sensibilidad¹⁸. Sin embargo, esta disminuye en muestras con múltiples tipos de VPH²⁷.

De las 98 muestras analizadas, la PCR SPF10 INNO-LiPA detectó ADN del VPH en 96 muestras, sin identificar genotipo alguno en una muestra. En cambio, la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} - EIA detectó ADN viral en 83 de 98 muestras. La PCR SPF10 INNO-LiPA detectó ADN viral en 6 muestras que fueron negativas por PCR PGMY09/11, asumimos que estas muestras tuvieron niveles bajos de ADN puesto que fueron positivas por la nPCR GP5/6. La PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} fue negativa en 11 muestras PCR PGMY09/11 positivas. Los sistemas de PCR que usan cebadores múltiples, tales como PGMY09/11 (5 forward y 13 reverse) o la SPF10, parecen ser más robustos que los sistemas que utilizan cebadores de consenso único, como GP5⁺/GP6⁺, siendo los primeros más eficientes para detectar múltiples infecciones²⁵.

Con respecto a la detección de VPH-AR, muchos estudios comparan el INNO-LiPA con métodos tales como multiplex PCR²⁸, AdvanSure (basado en RT-PCR)²⁹ o captura de híbridos HC2³⁰, encontrando valores de Kappa que van desde 0,44 a 0,98. Nuestros resultados muestran una buena concordancia (Kappa = 0,7) entre ambas técnicas para la detección de VPH 16/18 en muestras con mono-infecciones, aunque la concordancia de detección de VPH-AR (Kappa = 0,3) y VPH 16/18 (Kappa = 0,5) fue inferior (Tabla 2 y 5) cuando se incluyeron muestras con múltiples infecciones. De hecho, diferentes estudios reportan que la sensibilidad para discriminar genotipos está en función de la técnica empleada^{29,31}, pero en pocos estudios se especifica una diferencia de concordancia entre muestras con múltiples o mono-infecciones. Un solo estudio³¹ compara la tipificación del VPH de la (reverse line blotting) PCR GP5⁺/6⁺ - EIA-RLB (reverse line blotting) con la técnica INNO-LiPA y HPV Amplisense, encontrando una concordancia muy buena entre los dos primeros métodos (Kappa = 0,87) similar a la nuestra, en muestras con mono-infecciones.

Por otro lado, hemos observamos que el VPH 52 está mayoritariamente presente en las muestras genotipificadas por el sistema INNO-LiPA. Sin embargo, la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} -EIA cóctel 2 (en caso de muestras mono-infectadas con VPH 52, o en presencia de VPH 16 y/o 18 o con VPH de bajo riesgo) no lo detecto. Inicialmente, nos cuestionamos si había un problema con el oligonucleótido específico para VPH 52 del cóctel 2, sin embargo, revisando la bibliografía nos percatamos que los cebadores GP5⁺/GP6⁺ tienen menor sensibilidad para amplificar bajas cargas de VPH 52^{29,32}, igualmente cuando se compara con los cebadores MY09/11 o PGMY09/11^{33,34}, lo que explica la diferencia de detección de VPH 52 entre estas PCRs en nuestros ensayos.

En resumen, la técnica INNO-LiPA tiene mayor sensibilidad analítica e comparación con la PCR GP5⁺/GP6⁺ para la detección de una amplia gama de VPH^{24,32}. Sin embargo, la PCR GP5⁺/GP6⁺_{BIO} -EIA, presenta una buena especificidad para

detectar VPH 16/18, sobre todo en muestras con mono-infecciones. La frecuencia de múltiples infecciones (entre dos o tres genotipos por muestra) en este estudio es mayor entre mujeres de 20 a 29 años y disminuye a mayor edad, algo que está bien descrito³⁵. Además, en mujeres con citología normal o LSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo Grado), la frecuencia de diferentes genotipos de VPH es mayor que en mujeres con lesiones alto grado³⁶. Se debe considerar que los VPH 16/18 son responsables del 70 % de casos de cáncer de cuello uterino³⁷, la especificidad para la detección de estos genotipos en nuestro estudio fue moderada ($Kappa = 0,5$) en múltiples infecciones y buena ($Kappa = 0,7$) en mono-infecciones. Considerando estos aspectos la técnica PCR GP5+/GP6^{BIO}-EIA implementada puede ser recomendable en mujeres mayores de 30 años sobre todo para la detección de VPH 16/18. Para una mejor sensibilidad de detección esta técnica podría complementarse con otras tipos de PCR utilizando otros cebadores^{38,39}. También se sugiere realizar más estudios combinando diferentes oligonucleótidos de hibridación en función de la frecuencia de genotipos identificados en nuestra región.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World- Summary report. ICO/IARC Inf Cent HPV Cancer (HPV Inf Centre). 2019;(June):307. Disponible en: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
- Bruni L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, Muñoz J, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report WORLD BOLIVIA (PLURINA- TIONAL STATE OF). ICO/IARC Inf Cent HPV Cancer (HPV Inf Centre). 2019;(June). Disponible en:
- Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2010;116(1):177–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20567185/>.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10451482/>.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Koenraad D. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology*. 2010;401(1):70–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400342/>.
- de-Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur-Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15183049/>.
- Muñoz N, Bosch FX, De-Sanjósé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–27. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12571259/>.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology Journals. 2003;16(1):1–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12525422/>.
- Muñoz N, Castellsagué X, de-González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(SUPPL. 3):1–10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949995/>.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10(4):321–2. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350698/>
- World Health Organization. Biological agents. A review of human carcinogens. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012;100:1–441. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781184/>
- Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103:368–83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282563/>
- Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Chris CJL, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*. 2012;30:88–99. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23199969/>
- Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: Follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014;383(9916):524–32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24192252/>
- Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefèvre P, et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):928–34. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829119/>
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487–91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2448875/>
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618116/>
- De-Roda-Husman AM, Walboomers JMM, Van-den-Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76(4):1057–62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9049358/>
- Jacobs MV, Van-Den-Bride AJC, Snijders PJF, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JMM. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV 16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol*. 1996;49(3):223–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8818969/>
- Jacobs MV, Snijders PJF, Van-den-Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JMM. A general primer GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):791–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9041439/>
- Moller M, Viscidi RP, Sun Y, Guerrero E, Hill PM, Shah F, et al. Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology*. 1992;187(2):508–14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1312268/>
- Kleter B, Van-Doorn LJ, Ter Schegget J, Schrauwen L, Van-Krimpen K, Burger M, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1731–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9846964/>
- Altman D. PRACTICAL STATISTICS FOR MEDICAL RESEARCH. 1990. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9780429258589/practical-statistics-medical-research-douglas-altman>
- Kleter B, Van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, Ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1999;37(8):2508–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10405393/>
- Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst*

- Monogr. 2003;(31):80–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12807950/>
26. Jacobs MV, Walboomers JMM, Snijders PJF, Voorhorst FJ, Verheijen RHM, Fransen-Daalmeijer N, et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: The age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*. 2000;87(2):221–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10861478/>
27. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GYF, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304–10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229739/>
28. Else EA, Swoyer R, Zhang Y, Taddeo FJ, Bryan JT, Lawson J, et al. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with INNO-LiPA HPV genotyping extra assay. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1907–12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122697/>
29. Chung HS, Lee M. Comparison of the AdvanSure HPV GenoBlot assay with the INNO-LiPA HPV Genotyping assay for human papillomavirus genotyping. *J Clin Virol*. 2014;60(1):34–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24636736/>
30. Xu L, Padalko E, Oštrbenk A, Poljak M, Arbyn M. Clinical evaluation of INNO-LiPA HPV genotyping extra II assay using the VALGENT framework. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):1–11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165258/>
31. Gillio-Tos A, De-Marco L, Ghisetti V, Snijders PJF, Segnan N, Ronco G, et al. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J Clin Virol*. 2006;36(2):126–32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16624614/>
32. Hesselink AT, Van Ham MAPC, Heideman DAM, Groothuisink ZMA, Rozendaal Berkhof J. Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol*. 2008;46(10):3215–21. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566115/>
33. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GYF, Klein RS, et al. PCR detection of human papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304–10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229739/>
34. Chan PKS, Cheung TH, Tam AOY, Lo KWK, Yim SF, Yu MMY, et al. Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. *Int J Cancer*. 2006;118(1):243–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16032705/>
35. Van-den-Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, Snijders PJF. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):779–87. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120256/>
36. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. *Acta Biochim Pol*. 2008;55(4):687–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015776/>
37. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121:621–32. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17405118/>
38. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1050–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199790/>
39. Surriabre P, Torrico A, Vargas T, Ugarte F, Rodriguez P, Fontaine V. Assessment of a new low-cost, PCR-based strategy for high-risk human papillomavirus DNA detection for cervical cancer prevention. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1). Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4527-9>.