



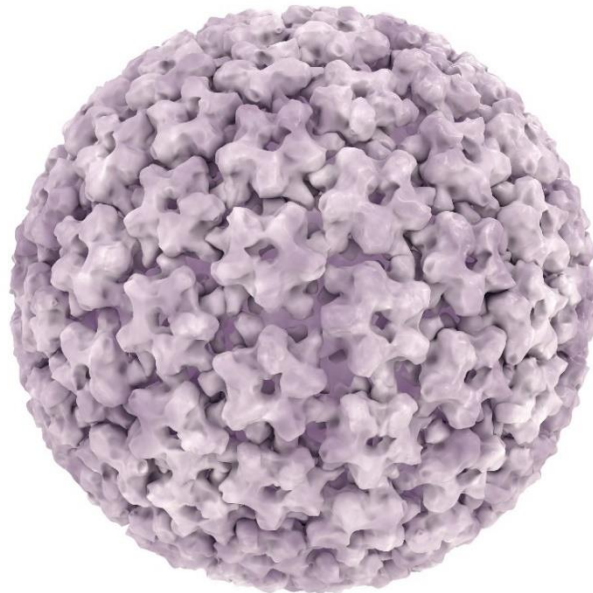
Universidad de Oviedo

Departamento de Biología Funcional

(Área de Microbiología)

TESIS DOCTORAL

***PAPILLOMAVIRUS* HUMANOS 16 Y 18:
PREVALENCIA EN LESIONES CERVICALES,
MARCADORES VIRALES DE PROGRESIÓN**



Sonia Pérez Castro

Oviedo, 2014

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento De Biología Funcional
(Área de Microbiología)

TESIS DOCTORAL

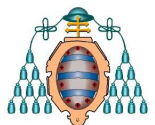
***PAPILLOMAVIRUS* HUMANOS 16 Y 18:
PREVALENCIA EN LESIONES CERVICALES,
MARCADORES VIRALES DE PROGRESIÓN**



Universidad de Oviedo

Sonia Pérez Castro

Oviedo, 2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: PAPILLOMAVIRUS HUMANOS 16 Y 18: PREVALENCIA EN LESIONES CERVICALES, MARCADORES VIRALES DE PROGRESIÓN	Inglés: HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 AND 18: PREVALENCE IN CERVICAL LESIONS, VIRAL MARKERS OF PROGRESSION
2.- Autor	
Nombre: PEREZ CASTRO, SONIA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: BIOLOGIA FUNCIONAL Y MOLECULAR	
Órgano responsable: BIOLOGÍA FUNCIONAL	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCION Y OBJETIVOS:

Conocer la prevalencia basal de papillomavirus humano (VPH) es esencial para evaluar el impacto de un programa de vacunación. Los objetivos del primer estudio fueron conocer:

- La prevalencia de VPH y distribución de VPH16 en neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o peor (CIN2+).
- El impacto esperado de la vacunación.

Los linajes de VPH16/18 podrían relacionarse con diferente oncogenicidad. Los objetivos del segundo estudio fueron conocer:

- La prevalencia de linajes de VPH16/18.
- Su asociación con lesiones de alto grado.

El polimorfismo T350G del VPH16 podría ser un factor de riesgo de progresión clínica. El objetivo principal del tercer estudio fue determinar:

- La sensibilidad, y especificidad de un nuevo método para detectar T350G.

La detección de ARNm de VPH podría ser útil para seleccionar mujeres candidatas a colposcopia. El objetivo del cuarto estudio fue evaluar:

- La utilidad del ARNm para predecir CIN2+ tras detección de ADN de VPH16/18.

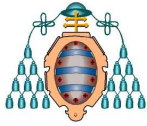
MATERIAL Y METODOS:

Se estudiaron mujeres que acudían a Unidades Ginecológicas en Vigo/Ourense (2006-2013) para la detección precoz de cáncer de cérvix. En el primer estudio, 94 CIN2+. En el segundo, 217 CIN2+ y 116 controles. En el tercero, 102 muestras previamente caracterizadas. En el cuarto, 165 mujeres ADN-positivas. Todas firmaron consentimiento informado (Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia). El genotipado de VPH se realizó mediante PCR convencional y secuenciación (región L1) y "Linear Array HPV genotyping test" (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los linajes de VPH se caracterizaron mediante análisis filogenético de secuencias LCR-E6. Para detectar T350G se sintetizaron 2 sondas TaqMan específicas de alelo. Para detectar ARNm se usó "NucliSens-EasyQ VPH E6/E7-mRNA" (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia).

RESULTADOS:

VPH16/31/51/52/18/35/45/56/58 se detectaron en 58/21/10/9/8/7/7/7/7% CIN2+ (dato crudo), respectivamente. En menores de 45 años, VPH16 se encontró en 42% de lesiones escamosas grado 2 y 75,5% de grado 3 o peor (CIN3-CIS/SCC). Con la vacunación se esperara un descenso del 51% de incidencia acumulada de CIN2+ en población general y del 63% de CIN3-CIS/SCC en menores de 45 años.

VPH18 se agruparon en los linajes A/B (89/11%). Los linajes B/A se detectaron respectivamente en 1/23 controles y 2/5 CIN3+ (OR 9). VPH16 se agruparon en los linajes A/B/C/D (87,5/1,3/2,7/8,4%). Los linajes D/A se encontraron respectivamente en 4/82 controles, 19/126 CIN3+ (OR 3), 6/1 lesiones glandulares de alto grado (OR 123) y 4/5 lesiones invasivas (OR 16). VPH16 A6803T/A6803 se detectaron en 3/88 controles, 5/1 lesiones glandulares de



alto grado (OR 147) y 4/4 lesiones invasivas (OR 29).

La sensibilidad del ensayo de discriminación alélica fue de 50 copias de T350G y su concordancia con la secuenciación fue del 100%.

La sensibilidad del ARNm para detección de CIN2+ fue cercana al 80%, mostrando un valor predictivo (VP) negativo del 90% en ausencia de alteraciones citológicas de alto grado (HSIL) y un VP positivo del 97% en HSIL.

CONCLUSIONES:

1. VPH16 es el genotipo más frecuente en CIN2+; VPH31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 y 58 también son comunes, sugiriendo que son necesarias vacunas frente a más genotipos.
2. Debido a la alta prevalencia del VPH16 en lesiones malignas en mujeres menores de 45 años, la vacunación será efectiva en estas mujeres.
3. El linaje A del VPH16 fue el más frecuente. El linaje D del VPH16 se asoció a un mayor riesgo de CIN3+, de lesiones glandulares de alto grado e invasivas.
4. El linaje A del VPH18 fue predominante. El linaje B del VPH18 podría tener mayor riesgo de CIN3+.
5. El SNP A6803T de VPH16 se asoció con un mayor riesgo de lesiones glandulares de alto grado e invasivas.
6. Un nuevo ensayo de discriminación alélica fue sensible y específico para detectar T350G de VPH16.
7. NucliSens-EasyQ fue útil como marcador viral de progresión en caso de detección de ADN de VPH16/18.

RESUMEN (en Inglés)

BACKGROUND AND OBJECTIVES:

To know the baseline prevalence of human papillomavirus (HPV) is essential to assess the impact of a vaccination program. The objectives of the first study were to know:

- The prevalence of HPV and distribution of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+).

- The expected impact of vaccination.

HPV16/18 lineages could be related with different oncogenicity. The objectives of the second study were to determine:

- The prevalence of HPV16/18 lineages.

- Its association with high-grade lesions.

The T350G polymorphism of HPV16 could be a risk factor for clinical progression. The main objective of the third study was to determine:

- The sensitivity and specificity of a new assay to detect T350G.

The detection of HPV mRNA could be useful to choose women candidates for colposcopy. The objective of the fourth study was to evaluate:

- The utility of mRNA in predicting CIN2+ after HPV16/18 DNA detection.

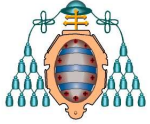
MATERIAL AND METHODS:

Women attending Gynecological Units in Vigo/Ourense (2006-2013) for early detection of cervical cancer were studied. In the first study, 94 CIN2+. In the second, 217 CIN2+ and 116 controls. In the third, 102 samples previously characterized. In the fourth, 165 women DNA-positive. All of them signed informed consent (Ethics Committee for Clinical Research of Galicia). HPV genotyping was performed by conventional PCR and sequencing (L1 region) and "Linear Array HPV genotyping test" (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). HPV lineages were characterized by phylogenetic analysis of LCR-E6 sequences. Two allele specific TaqMan probes were synthesized for T350G detection. "HPV EasyQ NucliSens-E6/E7 mRNA" (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) was used for mRNA detection.

RESULTS:

HPV 16/31/51/52/18/35/45/56/58 were detected in 58/21/10/9/8/7/7/7/7% CIN2+ (raw data), respectively. In women younger than 45 years old, HPV16 was found in 42% of grade 2 squamous lesions and 75.5% of grade 3 or worse (CIN3-CIS/SCC). With vaccination it is expected a decrease of 51% of CIN2+ cumulative incidence in general population and 63% of CIN3-CIS/SCC in women under 45 years.

HPV18 clustered into lineages A/B (89/11%). Lineages B/A were respectively detected in 1/23 controls and 2/5 CIN3+ (OR 9). HPV16 clustered into lineages A/B/C/D (87.5/1.3/2.7/8.4%). Lineages D/A were respectively found in 4/82 controls, 19/126 CIN3+ (OR 3), 6/1 high grade



glandular lesions (OR 123) and 4/5 invasive lesions (OR 16). HPV16 A6803T / A6803 controls were detected in 3/88, 5/1 high-grade glandular lesions (OR 147) and 4.4 invasive lesions (OR 29).

The sensitivity of the allelic discrimination assay was 50 copies of T350G and the concordance with sequencing was 100%.

The mRNA sensitivity for CIN2+ detection was about 80% showing a negative predictive value (PV) of 90% in the absence of high-grade cytological abnormalities (HSIL) and a positive PV of 97% in HSIL.

CONCLUSIONS:

1. HPV16 is the most prevalent genotype in CIN2+; HPV31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 and 58 are also common, suggesting that vaccines are needed against more genotypes.
2. Due to the high prevalence of HPV16 in malignant lesions in women less than 45 years old, vaccination will be effective in these women.
3. HPV16 lineage A was the most frequent. HPV16 lineage D was associated with an increased risk of CIN grade 3 or worse (CIN3+), high-grade glandular and invasive lesions.
4. HPV18 lineage A was predominant. HPV18 lineage B may have increased risk of CIN3+.
5. The SNP A6803T of HPV16 was associated with an increased risk of high-grade glandular and invasive lesions.
6. A new allelic discrimination assay was sensitive and specific for detecting HPV16-T350G.
7. NucliSens-EasyQ was useful as a progression marker in case of HPV16/18 DNA detection.

A Laura, Silvia, Marta y Pablo

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas.*

Mario Benedetti.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no sería posible sin tanta gente que me ha acompañado en estos años.

La Dra. María de Oña y el Dr. Santiago Melón, directores de la tesis, me iniciaron en la virología y el pensamiento científico. Su optimismo, entusiasmo y confianza, me animaron a embarcarme en este proyecto.

Mis compañeros microbiólogos de la EOXI de Vigo, entre ellos Isabel López-Miragaya y Julio Torres, apostaron por la investigación sobre el *Papillomavirus*, creyeron en la importancia del diagnóstico microbiológico de este virus y lucharon por su continuidad. La implicación personal de Ana Cid -microbióloga de la EOXI de Ourense-, Celia Varela y Sonia Rey ayudó decisivamente a la puesta en marcha, coordinación y seguimiento del estudio.

Los técnicos superiores de laboratorio del Servicio de Microbiología de la EOXI de Vigo contribuyeron con un trabajo excelente de genotipado del *Papillomavirus*.

Los profesionales de los servicios de Ginecología de las EOXI de Vigo y Ourense se ocuparon del diagnóstico y tratamiento de las mujeres incluidas en este trabajo. El tesón de Amparo Iñarrea, Maco Lamas y Teresa Sarán, y su inquietud profesional permitieron que las propias pacientes creyesen en este proyecto y me permitieron conocer las necesidades del día a día del diagnóstico del cáncer cervical. El trato cercano de las enfermeras de la unidad de Patología Cervical de la EOXI de Vigo hacia las pacientes facilitó su cooperación.

Alberto Malvar, del Servicio de Epidemiología de la Consellería de Sanidade, impulsó la vigilancia del impacto de la vacuna del *Papillomavirus* desde su introducción en Galicia.

No es posible nombrar a todos los numerosos profesionales de las EOXI de Vigo y Ourense que, con su trabajo diario, también colaboraron de forma crucial.

Los compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital Central de Asturias me mostraron durante mi formación el valor del sentido del humor y la iniciativa en el trabajo.

Mi familia ha sido mi apoyo en estos años. Mis padres y hermanas creyeron en mí, en mi trabajo. Marta y Silvia fueron comprensivas y generosas, siempre ilusionadas. Laura nos hizo valientes. Pablo aportó soluciones tecnológicas originales a esta investigación pero, sobre todo, el convencimiento de que “todos tus sueños pueden hacerse realidad si tienes el coraje de perseguirlos”. Esfuerzo y confianza podrían ser nuestro sello de identidad.

Muchas gracias a todos.

FINANCIACIÓN

Los trabajos de investigación que componen esta tesis doctoral han sido financiados por la Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 EL CÁNCER DE CÉRVIX	13
1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	16
1.2.1 Examen citológico	16
1.2.2 Examen colposcópico.....	17
1.2.3 Diagnóstico histológico	17
1.3 ETIOPATOGENIA DE LA DISPLASIA CERVICAL Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VPH	20
1.3.1 Genoma y estructura del <i>Papillomavirus</i> humano.....	20
1.3.2 Clasificación de VPH.....	27
1.3.3 Coevolución de VPH y especie humana. Linajes de VPH16 y VPH18.....	30
1.3.4 Manifestaciones clínicas de genotipos	31
1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y FACTORES DE PROGRESIÓN.....	33
1.4.1 Detección de ADN viral y genotipado	33
1.4.2 Detección de ARN viral.....	34
1.4.3 Detección de proteínas celulares.....	35
1.4.4 Linajes de VPH16 y VPH18	36
1.4.5 Linajes de VPH16 y patogénesis cervical.....	36
1.4.6 Linajes de VPH18 y patogénesis cervical.....	37
1.5 FACTORES AMBIENTALES Y CÁNCER CERVICAL	38
1.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	38
1.6.1 Prevención primaria.....	39
1.6.2 Prevención secundaria	41
2 OBJETIVOS.....	45
3 MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1 POBLACIÓN A ESTUDIO	53
3.1.1 Seguimiento clínico	54
3.1.2 Datos epidemiológicos.....	56
3.1.3 Comité de ética	56
3.2 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E HISTOLÓGICO	56
3.3 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO	57
3.3.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	57
3.3.2 Detección de ADN de VPH.....	57

3.3.3	Detección de ARN de VPH	59
3.3.4	Detección de linajes de VPH16 y VPH18	59
3.3.5	Caracterización de la región L1 de VPH16.....	60
3.3.6	Detección del SNP T350G en la región E6 de VPH16	60
3.4	CÁLCULO DEL IMPACTO VACUNAL.....	61
3.5	ANÁLISIS DE DATOS	62
4	RESULTADOS.....	63
5	DISCUSIÓN.....	99
6	CONCLUSIONES	117
7	BIBLIOGRAFÍA	121

ABREVIATURAS

AC: adenocarcinoma

AIS: adenocarcinoma *in situ*

ASC-H: células escamosas atípicas, no puede descartarse lesión de alto grado

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado

CES: carcinoma de células escamosas

CIN1: neoplasia intraepitelial cervical de grado 1

CIN2: neoplasia intraepitelial cervical de grado 2

CIN2+: neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o peor

CIN3-CIS: neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 - carcinoma *in situ*

CIN3+: neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 o peor

CIS: carcinoma *in situ*

EM: estimación máxima

EV: epidermodisplasia verruciforme

HSIL: lesión intraepitelial de alto grado

IARC: Agencia Internacional para Investigación en Cáncer

IC: intervalo de confianza

LCR: región larga de control

LSIL: lesión intraepitelial de bajo grado

NASBA: amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos

NILM: negativo para lesión intraepitelial o neoplasia maligna

OR: *odds ratio*

ORF: marco de lectura abierto

PAE: sitio de poliadenilación temprana

PAL: sitio de poliadenilación tardía

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: promotor temprano

PL: promotor tardío

RT-PCR: transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

Taq: *Thermus aquaticus*

UEC: unión escamoso-columnar

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VLP: partículas similares a virus

VP: *Papillomavirus*

VPH: *Papillomavirus* humano

VPH-AR: *Papillomavirus* humano de alto riesgo

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER DE CÉRVIX

El cáncer de cuello uterino aparece en la mujer como consecuencia de la infección persistente por ciertos genotipos de *Papillomavirus* humano (VPH). Actualmente provoca más de 265.000 muertes al año en el mundo (Ferlay *et al.*, 2013). La enfermedad presenta una distribución global muy desigual: más del 85 % de los casos se encuentran en países en vías de desarrollo. La mayor incidencia y mortalidad se observa en África Subsahariana, América Central, Asia Central y del Sur y Malasia. Este desequilibrio se puede explicar por diferencias en el riesgo de exposición a la infección por VPH y por el hecho de que el cáncer cervical es prevenible mediante un cribado eficaz y más recientemente por una vacunación que parece efectiva. En España, el cáncer cervical es la décima causa de aparición de nuevos casos de cáncer en mujeres, provocando anualmente 800 muertes (Ferlay *et al.*, 2013).

El endocérvix, porción fibromuscular que conecta el útero con la vagina, está rodeado por un epitelio columnar formado por una sola capa de células. Este epitelio no forma una superficie lisa en el canal cervical sino que se invagina dando lugar a la formación de criptas endocervicales (a veces llamadas glándulas endocervicales). El ectocérvix (orificio cervical externo) está cubierto por un epitelio escamoso estratificado rosado formado por múltiples capas de células localizadas sobre el estroma. La unión escamoso-columnar (UEC) es la unión entre las células glandulares columnares del canal endocervical y las células escamosas del ectocérvix. La localización de la UEC en relación con el orificio cervical externo varía según la edad, el estado menstrual y otros factores como el embarazo o el uso de anticonceptivos orales (fig. 1).

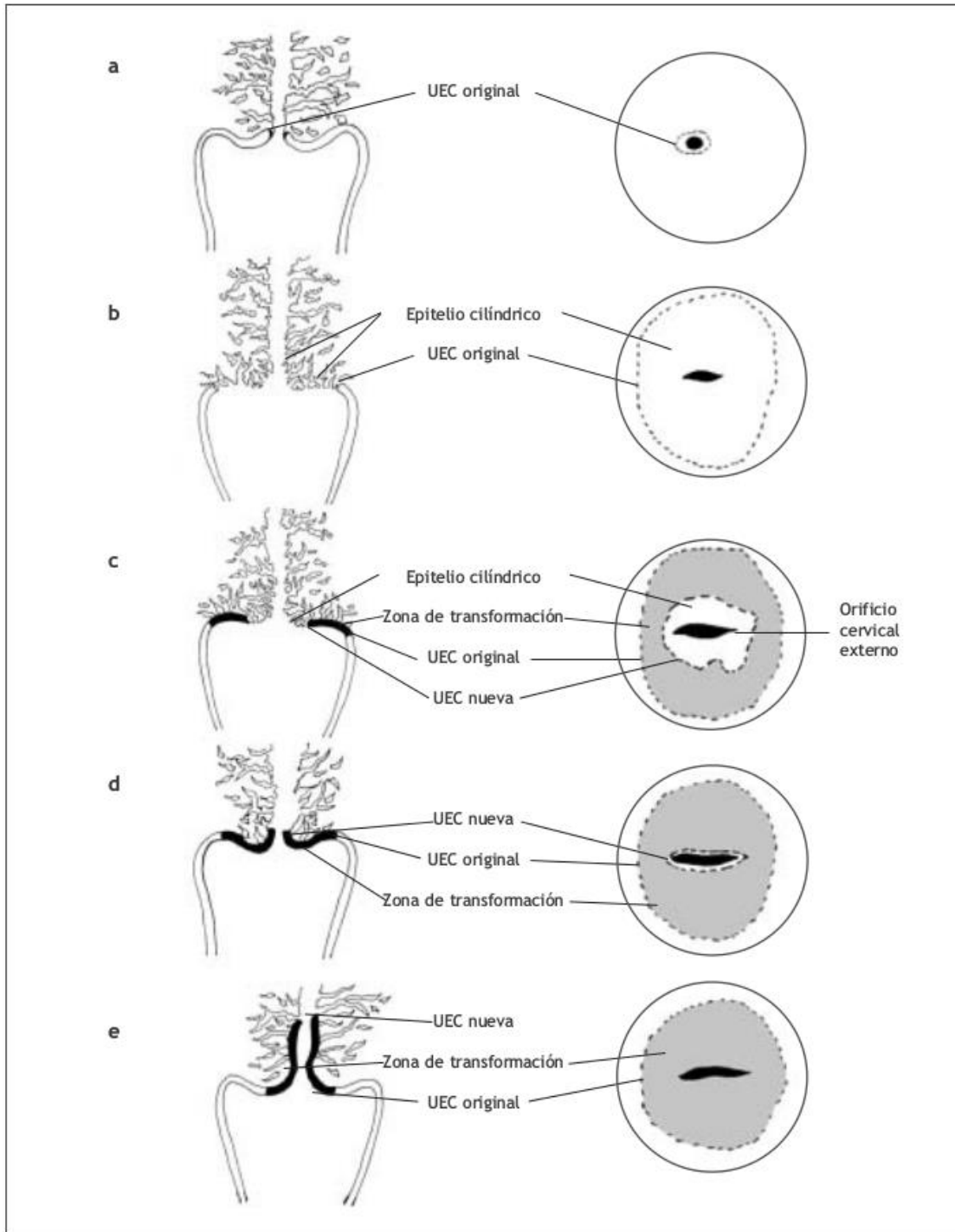


Fig. 1. Ubicación de la UEC y la zona de transformación: a) antes de la menarquia; b) tras la pubertad y al principio del período reproductivo; c) hacia los 30 años; d) hacia la menopausia; e) después de la menopausia (Sellors, 2003).

Localizada en la UEC se encuentra la zona de transformación donde se reemplaza de forma fisiológica el epitelio columnar por un nuevo epitelio escamoso formado desde las células de reserva subcolumnares en el ectocérvix. Este proceso se denomina metaplasia escamosa.

La metaplasia escamosa es un proceso irreversible: el epitelio transformado no puede volver a convertirse en columnar. El epitelio metaplásico adyacente a la UEC es inmaduro, mientras que el epitelio metaplásico maduro se encuentra cerca de la UEC original. El epitelio metaplásico inmaduro puede evolucionar de dos modos: en la gran mayoría de las mujeres, se convierte en epitelio metaplásico escamoso maduro, similar al epitelio escamoso original normal que contiene glucógeno; en la minoría, puede evolucionar a epitelio atípico displásico.

Algunos tipos de VPH pueden infectar persistentemente las células metaplásicas basales inmaduras y transformarlas en células atípicas con anomalías nucleares y citoplasmáticas. La proliferación y la expansión no controladas de estas células atípicas pueden conducir a la formación de un epitelio displásico anormal que, a su vez, puede volver a su estado normal, persistir como displasia (también denominada neoplasia intraepitelial cervical o CIN) o evolucionar a cáncer invasivo al cabo de varios años.

Aproximadamente un 80-90 % de los cánceres cervicales son carcinomas de células escamosas y un 10-20 % son adenocarcinomas (carcinoma de glándulas endocervicales), aunque el porcentaje de estos últimos se ha incrementado en los últimos años. Ocasionalmente los cánceres cervicales tienen características comunes a ambos tipos, y se denominan adeno-escamosos. En sus estadios tempranos pueden ser asintomáticos, pero en los estadios tardíos pueden presentarse con sangrado vaginal anormal, descarga, dolor pélvico o dolor durante las relaciones sexuales.

1.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

1.2.1 Examen citológico

El examen citológico consiste en la observación microscópica de las células escamosas obtenidas con una espátula de madera o por cepillado de la zona endocervical tras ser fijadas y teñidas con la técnica de Papanicolaou. Las observaciones se clasifican según la nomenclatura Bethesda 2001 (Solomon *et al.*, 2002):

- Negativo para lesión intraepitelial o neoplasia maligna (NILM).
- Anomalías de células epiteliales escamosas:
 - Células escamosas atípicas (ASC).
 - Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US).
 - Lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL), cuando se observan células con núcleos agrandados irregulares y más marcados de lo normal.
 - Lesión intraepitelial de alto grado (HSIL), cuando se observan células inmaduras, células pequeñas en láminas y agrupamientos sincitiales y con bordes citoplasmáticos diferenciados.
 - Células escamosas atípicas, no puede descartarse HSIL (ASC-H).
 - Carcinoma de células escamosas (CES).
- Anomalías de células epiteliales glandulares:
 - Células glandulares atípicas (AGC) (endocervicales, endometriales o no especificadas).
 - Células glandulares atípicas, probablemente neoplásicas (endocervicales, endometriales o no especificadas).
 - Adenocarcinoma endocervical *in situ* (AIS).
 - Adenocarcinoma (AC).
- Otros

1.2.2 Examen colposcópico

Clínicamente las lesiones precancerosas solo pueden visualizarse con la ayuda del colposcopio -que magnifica el epitelio- tras la aplicación de solución salina, ácido acético diluido entre el 3-5 % y la solución yodoyodurada de lugol (prueba de Schiller) en pasos sucesivos.

Las zonas de displasia y de cáncer invasor se tornan densamente blancas y opacas inmediatamente después de la aplicación del ácido acético (acetoblanqueo). En la prueba de Schiller las zonas de CIN y el cáncer invasivo no captan el yodo por carecer de glucógeno y se ven como zonas gruesas de color amarillo mostaza o azafrán. Las zonas de leucoplasia o los condilomas pueden no teñirse. Este examen ayuda a identificar las lesiones que pasaron desapercibidas durante el examen con solución salina y ácido acético, así como a delimitar con mayor precisión la extensión de las zonas a tratar. Los hallazgos colposcópicos se anotan según la nomenclatura de la Federación Internacional de Patología Cervical y Colposcopia (FIPCC) (Quaas *et al.*, 2013). Es de gran importancia la identificación de la zona de transformación en la colposcopia ya que la mayoría de los cánceres cervicales se desarrollan en esta zona.

1.2.3 Diagnóstico histológico

Puede sospecharse la existencia de neoplasia por el resultado del examen citológico o colposcópico, pero el diagnóstico definitivo debe establecerse siempre por el examen histológico de una biopsia cervical dirigida según visualización colposcópica. Permite valorar si una muestra tisular cervical presenta displasia y en qué grado en función de la proporción de epitelio afectado:

- CIN de grado 1 (CIN1): existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas. Es muy poco probable que progrese a cáncer.

- CIN de grado 2 (CIN2): las células displásicas se restringen a la mitad o dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en el CIN1.
- CIN de grado 3 - carcinoma *in situ* (CIN3-CIS): células anormales en todas las capas del epitelio escamoso. Lesión escamosa preneoplásica que puede progresar a cáncer si no se trata.
- AIS: proliferación anormal no invasiva de células glandulares, que se cree que precede a la aparición del adenocarcinoma. Lesión glandular preneoplásica.
- Carcinoma de células escamosas (CES): neoplasia de células escamosas, con infiltración de tejidos circundantes.
- AC: neoplasia de células glandulares, con infiltración de tejidos circundantes.

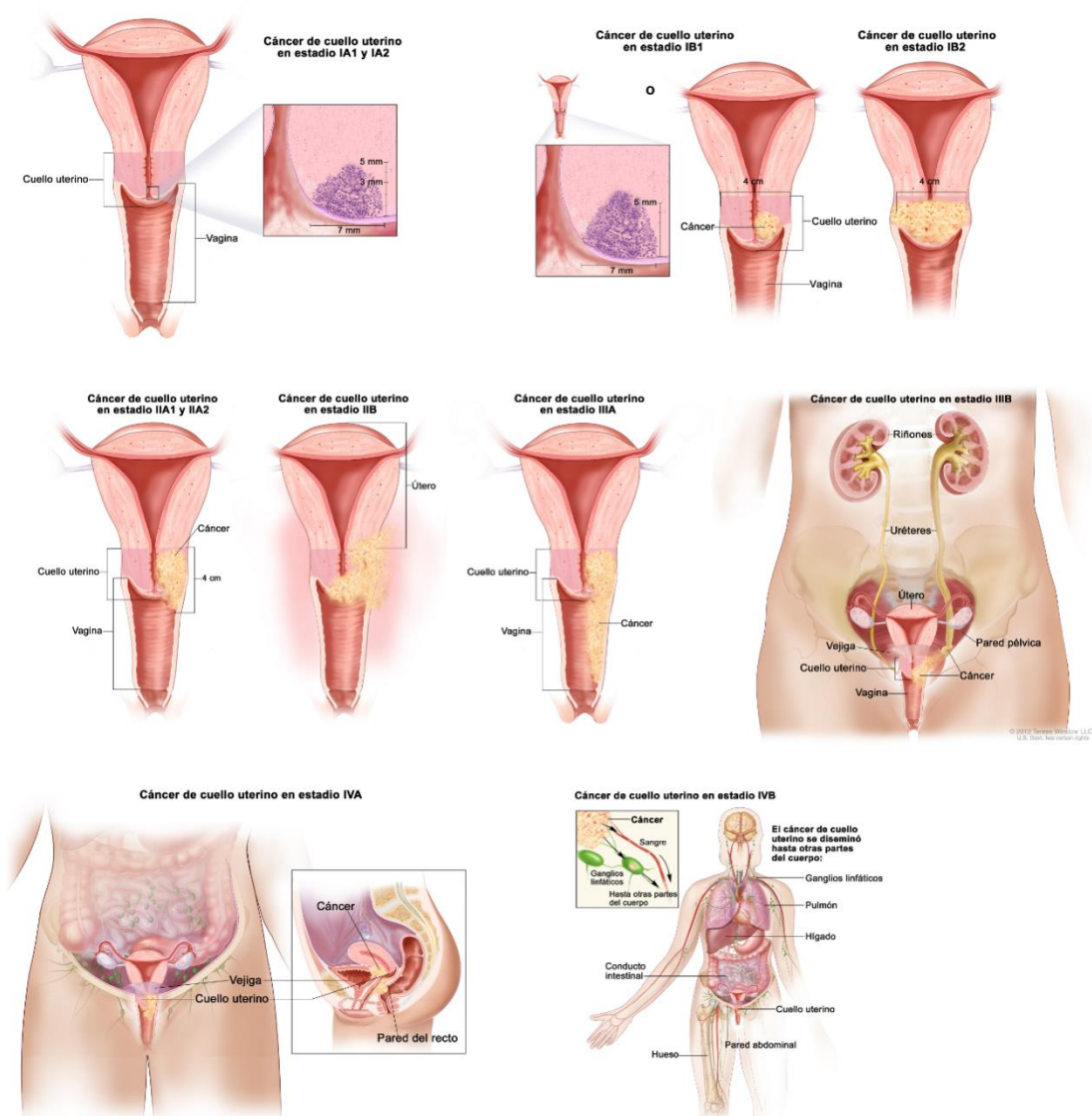
La correlación entre la citología y la histología (tabla 1) no es buena, particularmente en la categoría de citología de significado indeterminado (ASC-US) ya que aproximadamente un 20 % de estos casos ocultan una displasia de grado 2 o peor.

Tabla 1. Clasificación de anomalías cervicales citológicas e histológicas

Bethesda 2001	Clasificación histológica
NILM	Negativa
ASC-US/AGUS/ASC-H	Atipia escamosa
LSIL	CIN1
HSIL	CIN2
	CIN3, carcinoma <i>in situ</i>
Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

El cáncer invasivo penetra a través de la membrana basal hasta llegar al estroma subyacente. Las células malignas pueden subdividirse en queratinizantes y no queratinizantes; los tumores pueden ser bien diferenciados, moderadamente diferenciados o mal diferenciados. El grado de extensión del cáncer se evalúa tanto clínicamente como mediante diversos estudios, para determinar el estadio de la enfermedad según la clasificación elaborada por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (fig. 2):

- Estadio I: carcinoma estrictamente limitado al cuello uterino.
- Estadio II: el carcinoma se extiende más allá del cuello uterino, pero no invade la pared pélvica.
- Estadio III: invasión de la pared pélvica lateral. El tumor llega al tercio inferior de la vagina.
- Estadio IV: invasión más allá de la pelvis verdadera o ha invadido clínicamente la mucosa de la vejiga urinaria, del recto o de ambos.



© 2012 Terese Winslow para el Instituto Nacional del Cáncer. El gobierno de EUA tiene ciertos derechos.

Fig. 2. Estadios en el cáncer cervical invasivo.

1.3 ETIOPATOGENIA DE LA DISPLASIA CERVICAL Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VPH

1.3.1 Genoma y estructura del *Papillomavirus* humano

Los virus de la familia *Papillomaviridae* están formados por una cápside icosaédrica desnuda compuesta por 72 capsómeros que mide unos 60 nm de diámetro y por un genoma de ADN circular de doble cadena superenrollado de aproximadamente 8.000 pb.

El ADN viral contiene ocho genes que codifican seis proteínas tempranas (E) y dos proteínas tardías (L) y una región larga no codificadora de control (LCR). E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican proteínas involucradas en la replicación, transcripción y transformación. L1 y L2 codifican proteínas de la cápside (fig. 3).

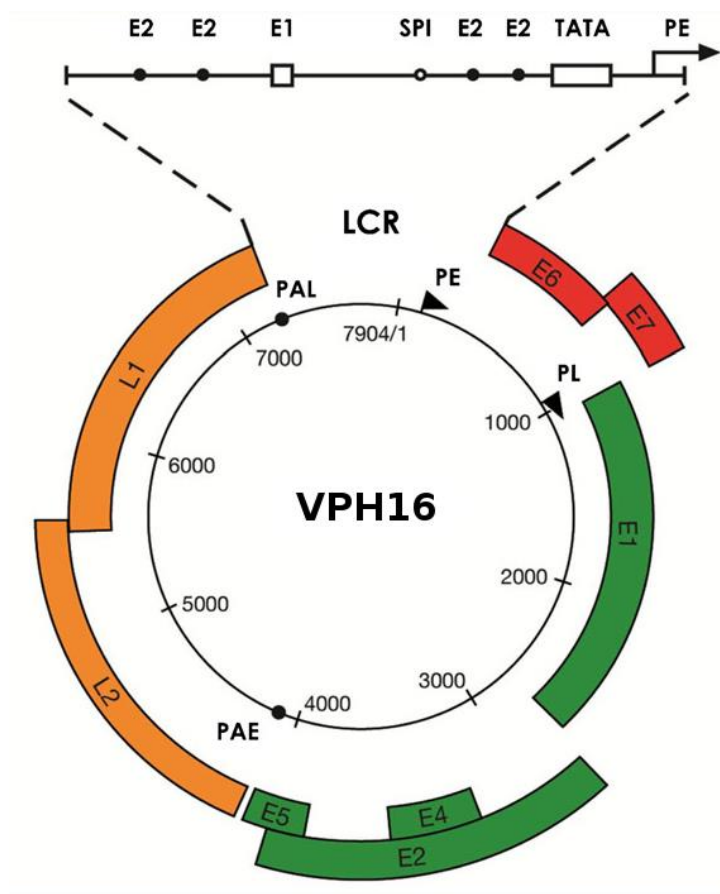


Fig. 3. Representación del genoma completo de VPH16. Promotor temprano (PE). Promotor tardío (PL). Sitio de poliadenilación temprana (PAE). Sitio de poliadenilación tardía (PAL) (Doorbar et al., 2012).

La cápside contiene 360 copias de la proteína mayor de la cápside (L1) y unas 12 copias de la proteína menor de la cápside (L2), organizadas en una cubierta icosaédrica de 72 capsómeros. L1 es una proteína de aproximadamente 55 kD con la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en partículas similares a virus (VLP). Estas partículas presentan una superficie exterior indistinguible del virión nativo. Estas VLPs son inmunógenos potentes probablemente debido a la capacidad innata de las células B para reconocer sus epitopos de superficie. Este descubrimiento supuso el fundamento del desarrollo de las vacunas actuales.

Tres proteínas tempranas del virus (E5, E6 y E7) son oncoproteínas que estimulan la proliferación celular, la supervivencia celular y modulan la diferenciación de los queratinocitos. Las proteínas E6 y E7 en ocasiones tienen la capacidad de inducir lesiones intraepiteliales displásicas y malignas.

En su genoma contienen también un gran número de regiones reguladoras (elementos cis-sensibles) que regulan la replicación y la transcripción de los genes del virus. También determinan el rango de células epiteliales que el virus puede infectar, conectan la expresión de genes tardíos y tempranos a la diferenciación del epitelio escamoso y modulan la biología viral en respuesta a hormonas y factores de crecimiento. La mayoría de estos elementos se encuentran en la región LCR que no contiene ningún marco abierto de lectura (ORF) y abarca aproximadamente un 10 % el genoma de los VPH. La parte 3' del LCR contiene el sitio mayor de inicio de transcripción (p97 en VPH16, p105 en VPH18) del promotor E6. La parte 5' del LCR codifica la señal de terminación de transcripción de los transcritos tardíos, el potenciador central del LCR y elementos silenciadores. Esta región se ha conservado por varias decenas de miles de años, sugiriendo una función de modificación de secuencias específicas y elementos reguladores en la biología de los *Alfapapillomavirus*.

Ciclo vital del *Papillomavirus* humano

La infección inicial viral requiere el acceso de las partículas infecciosas a las células de la lámina basal, facilitado por una ruptura en el epitelio escamoso (microtraumas) y su unión al

exterior de las células. La infección de células columnares puede facilitar la formación de lesiones cervicales, para a continuación pasar a la lámina basal del epitelio escamoso estratificado de la zona de transformación. El virus se deshace de la cubierta mediante la ruptura de puentes disulfuro intracapsómicos en el ambiente reductor de la célula, permitiendo que el ADN viral sea transportado al núcleo.

Una vez que el genoma llega al interior del núcleo, se cree que el virus mantiene su genoma de forma episomal, en un bajo número de copias en las células basales del epitelio (10-200 copias por célula) y que se expresan las proteínas virales tempranas (E6, E7, E1, E2) a un bajo nivel. Mediante la expresión de las proteínas virales E1 y E2 se mantiene el ADN viral como episoma y se facilita la correcta segregación de genomas durante la división celular (Fig. 4).

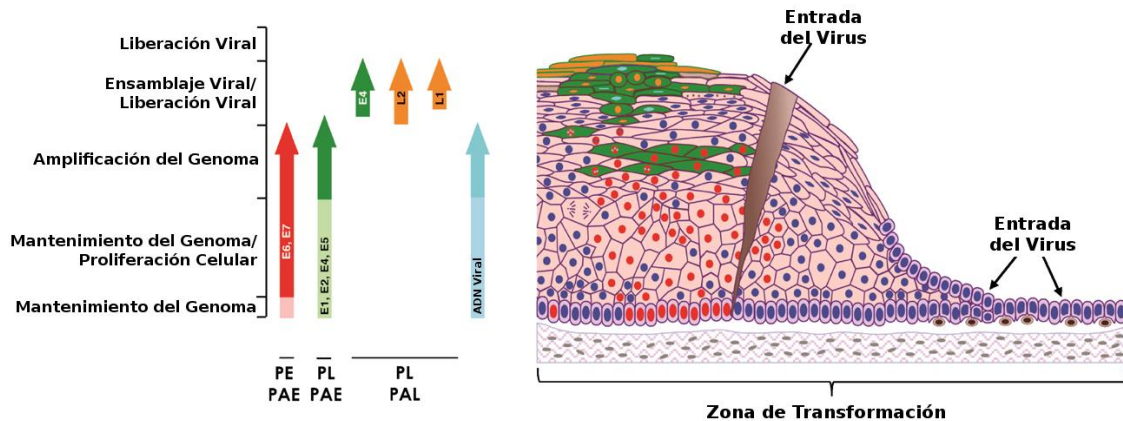


Fig. 4. Ciclo vital del VPH (Doorbar et al., 2012).

Durante la infección por VPH, la proteína E7 (y probablemente también E6) se expresa en estas células, retardando su diferenciación terminal normal, estimulando la progresión del ciclo celular y asociándose con reguladores del ciclo celular. La proteína E7 se une a pRb (un regulador negativo del ciclo celular), inactivándolo. Como consecuencia se libera el factor de transcripción E2F que activa la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular y en la síntesis de ADN. Durante la infección productiva solo un pequeño grupo de células en

las láminas parabasales son mitóticamente activas. La proteína E6 se asocia con proteínas proapoptosis como por ejemplo p53, por lo que se considera un factor predisponente al desarrollo de cánceres asociados al VPH, permitiendo la acumulación de errores aleatorios en el ADN de la célula hospedadora. La proteína E6 también puede estimular la proliferación celular independientemente de E7 mediante su unión al ligando PDZ y contribuir al desarrollo de tumores metastásicos al alterar la adhesión celular normal. Otras proteínas virales tempranas como E1, E2, E4, E5 se expresan antes de la amplificación genómica para asegurar el mantenimiento del episoma viral en un bajo número de copias.

Infección productiva

El virión completo se forma en las capas epiteliales medias o superiores, tras el incremento de la actividad del promotor tardío. Este promotor reside dentro del ORF del E7 y se cree que su regulación positiva sigue a la expresión incrementada de proteínas que intervienen en la replicación del ADN viral (E1, E2, E4, E5). La amplificación del genoma viral comienza en un grupo de células proliferativas y requiere la expresión de todos los productos de los genes tempranos incluyendo E4 y E5. La unión de E2 a la región reguladora localizada en una zona anterior del genoma es necesaria para la replicación del ADN viral y engancha la ADN helicasa-E1 al origen viral de replicación. Este ensamblaje del complejo de iniciación E1/E2 al origen viral es análogo a la formación del complejo entre proteínas celulares de iniciación en el origen celular y puede permitir la replicación de los genomas virales en ausencia de síntesis de ADN celular. A lo largo del ciclo vital del virus, los niveles relativos de las diferentes proteínas virales son controlados por el uso de promotores y por selección diferencial de sitios de *splicing* con un incremento en los niveles de E1 y E2 permitiendo un incremento en el número de copias virales en las capas epiteliales superiores.

Las proteínas estructurales L1 y L2 se producen en un grupo de las células que expresan E4. Aunque las VLP podrían ensamblarse en ausencia de L2, ésta mejora el ensamblaje y su

infectividad. Los VPH no son líticos y no se liberan hasta que las células infectadas alcanzan la superficie epitelial.

Los VPH son resistentes a la desecación y su supervivencia extracelular puede aumentar si se eliminan dentro de células escamosas. La retención intracelular de los antígenos virales hasta que la célula alcanza las capas epiteliales más superficiales puede comprometer la detección inmune del virus, particularmente mientras el virus adquiere mecanismos moleculares que limitan la presentación de sus epitopos al sistema inmune en las capas más bajas.

Infección latente

Aunque la amplificación y el empaquetamiento son necesarios para la formación de nuevos viriones, la infección puede seguir otro camino: el sistema inmune puede controlar la expansión de la enfermedad asociada a VPH. Tras la regresión inmune, el ADN viral permanece en las células epiteliales basales para ser reactivado cuando los niveles de inmunidad declinan. El patrón de expresión de genes virales en las capas celulares basales durante la infección latente puede ser similar al patrón de expresión en estas capas durante la infección productiva. Se ha sugerido que esta expresión latente de genes se restringe a E1 y E2 y que durante esta fase no requiere los genes E6 ni E7.

Los pacientes con defectos inmunitarios son particularmente sensibles a la infección y pueden desarrollar lesiones extensas refractarias al tratamiento. La infección por VPH es un problema particularmente importante en pacientes trasplantados renales, individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con defectos genéticos que afectan a la función de la inmunidad celular.

Progresión a cáncer cervical

En ausencia de regresión, las lesiones pueden persistir y en algunos casos, progresar a cáncer. Una característica común a los virus tumorales es su capacidad para causar tumores en los sitios donde su ciclo viral productivo no puede llevarse a cabo. Las lesiones de bajo grado se asocian a infecciones productivas por VPH mientras que en las lesiones de grado moderado o

alto se observa una fase proliferativa más extensa con un mantenimiento pobre de los estados productivos del ciclo viral (fig. 5).

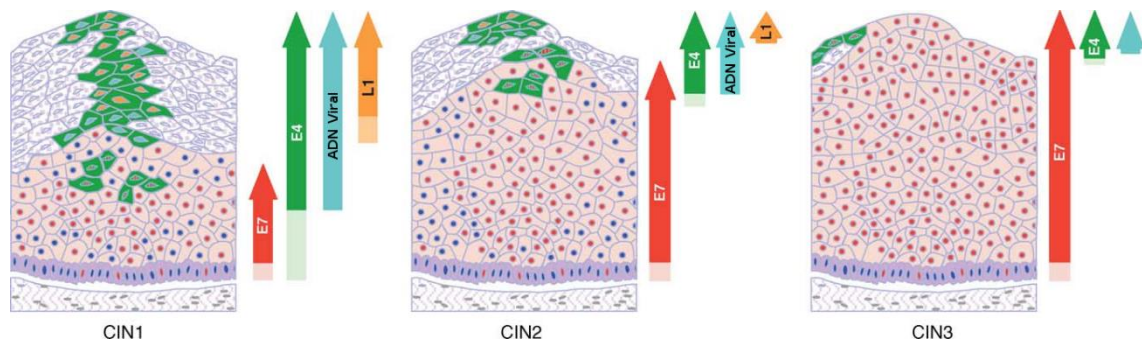


Fig. 5. La infección productiva predomina en lesiones de bajo grado (CIN1). La proliferación celular predomina en lesiones de grado moderado o alto (CIN2, CIN3) (Doorbar, 2005).

El evento clave en la progresión de lesiones productivas a neoplasia de alto grado podría ser la desregulación de la expresión de las proteínas virales transformadoras (E6 y E7), lo que llevaría a una proliferación celular incrementada en las capas epiteliales inferiores y a una incapacidad para reparar mutaciones secundarias en el ADN de las células hospedadoras. La progresión del CIN3 al cáncer generalmente ocurre en lesiones que contienen copias integradas del genoma viral en las cuales la expresión de E7 está elevada. Por lo tanto la retención de los genes E6 y E7 y la pérdida de los genes E2 y E4 -que pueden ejercer un efecto negativo en el crecimiento celular- generalmente acompañan al desarrollo de cáncer cervical invasivo.

El sello distintivo de alto riesgo de actividad oncogénica E6 es la degradación del gen supresor de tumores p53 que detiene el ciclo celular al inducir la expresión de los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina p16 (p16INK4a), p21 y p27.

La oncoproteína E7 de los genotipos de alto riesgo tiene la capacidad de iniciar la síntesis de ADN en las células epiteliales diferenciadas y puede interactuar con otros factores celulares que controlan el ciclo y disminuir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, lo que interfiere con la presentación del antígeno,

provoca la regulación negativa de la respuesta inmune celular y, por lo tanto, permite que el VPH persista en células epiteliales infectadas.

La alteración somática de genes específicos junto a ciertos eventos epigenéticos determina el desarrollo de malignidad. Entre estos eventos, los más significativos son la metilación de bases de citosina del ADN y la modificación de histonas (metilación o acetilación) asociadas con el silenciamiento de genes supresores de tumores (fig. 6).

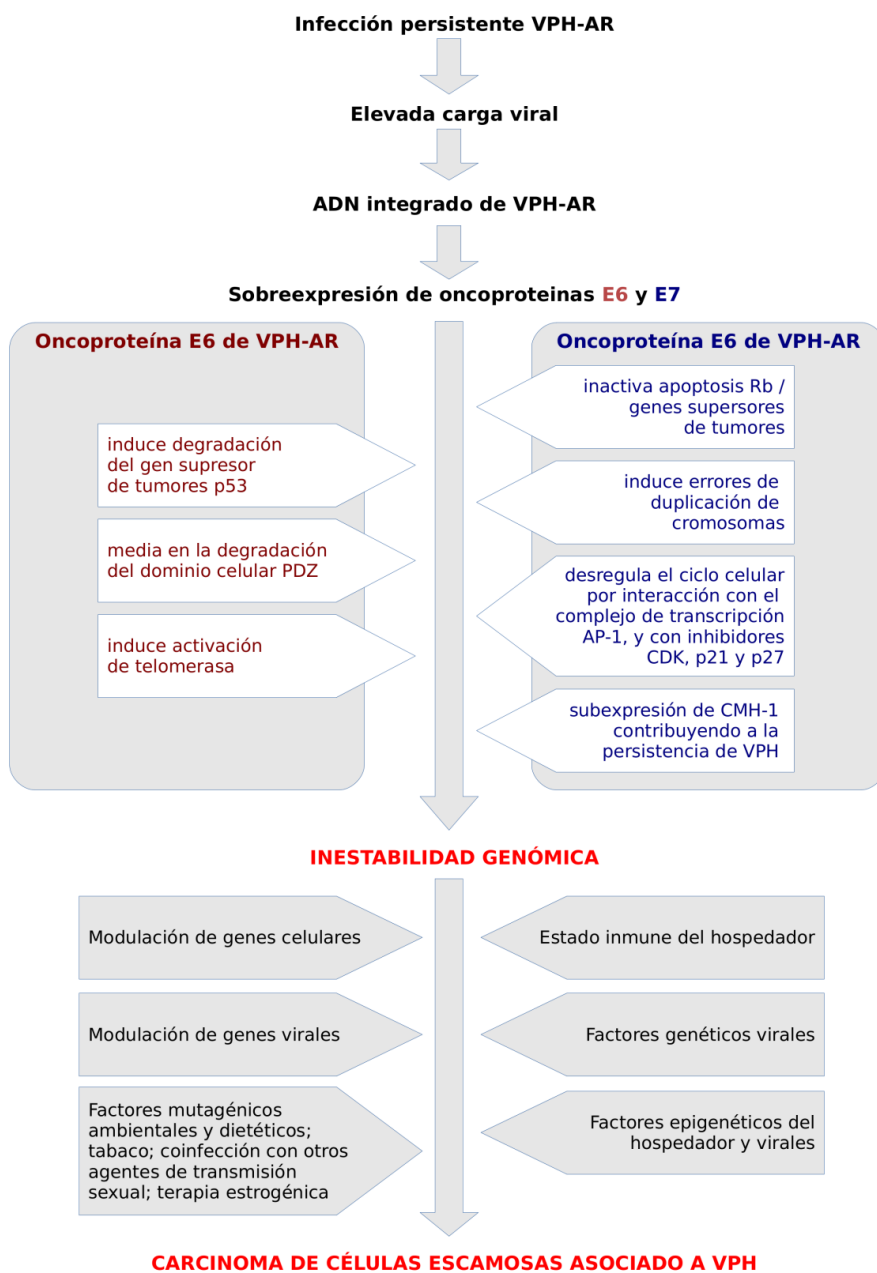


Fig. 6. Patogénesis del carcinoma de células escamosas. Adaptado de (Feller et al., 2010).

1.3.2 Clasificación de VPH

Se han identificado *Papillomavirus* (VP) específicos de especie: de humanos, de diferentes mamíferos y de aves. Los VPH son un grupo grande y diverso de virus con 174 genotipos completamente caracterizados y con nuevos genotipos que se están encontrando de forma continuada y que se agrupan en cinco géneros mayores: *Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mu papillomavirus* y *Nu papillomavirus* (fig. 7).

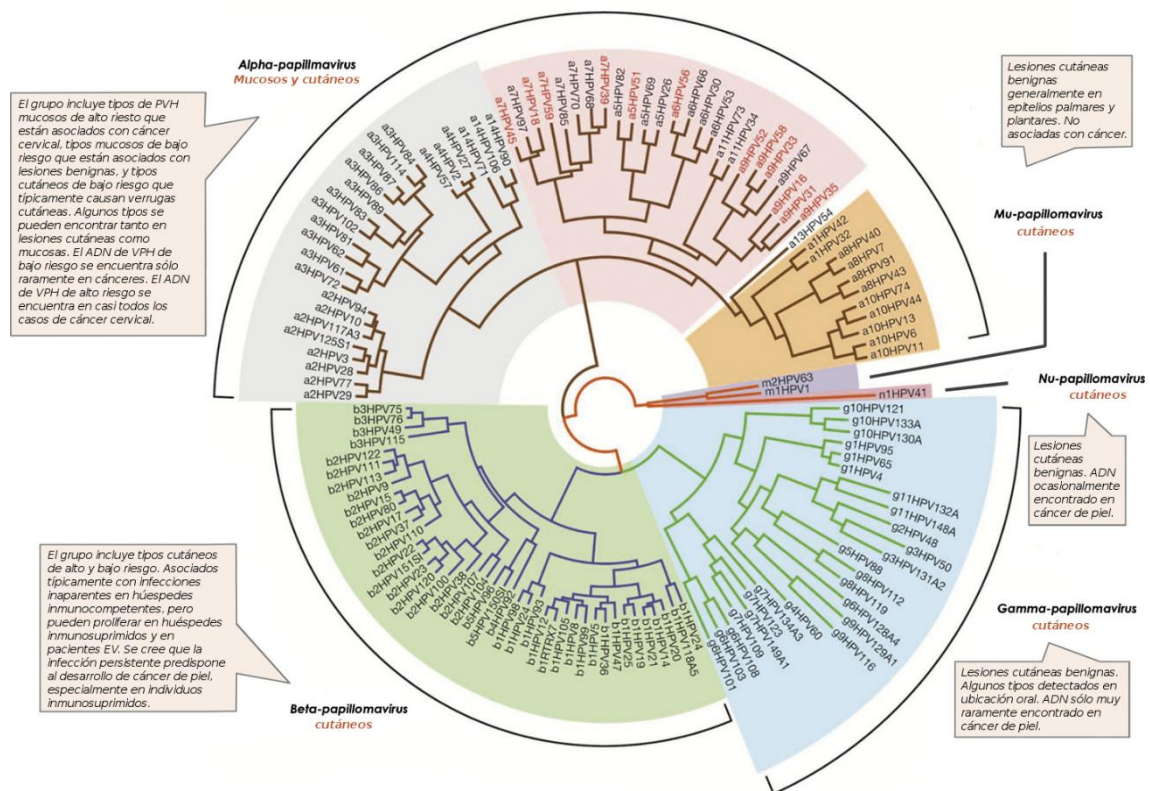


Fig. 7. Relaciones evolutivas entre los Papillomavirus humanos (Doorbar et al., 2012).

Los VPH replican sus genomas utilizando la maquinaria enzimática del hospedador, asegurándose un alto grado de revisión de secuencias en la lectura con bajos porcentajes de mutaciones. Con la evolución de sus genomas, mutaciones, inserciones/delecciones (indel), y reagrupamientos han sido seleccionados y/o fijados en tipos concretos, perdiéndose el genoma intermediario. Dado que la recombinación es un evento extremadamente raro en estos virus, las múltiples mutaciones/variaciones que han ocurrido en los genomas de VP no están relacionadas con la distancia genética como en genomas recombinantes, sino con la

acumulación secuencial de cambios genéticos. Este proceso de especiación se ha denominado fijación de linaje. Es decir, grupos de mutaciones puntuales (polimorfismos de un solo nucleótido también denominados SNPs) y/o indels tienden a fijarse dentro de linajes virales. A lo largo del tiempo, la cantidad de estas variaciones definitorias de linaje se incrementa llevando eventualmente a la especiación (genotipos).

Se ha definido que los genotipos que pertenecen a diferentes géneros de VP tienen menos de un 60 % de similitud en su secuencia de nucleótidos de la proteína de la cápside L1 (fig. 8). Cada genotipo difiere al menos en un 10 % de su genoma.

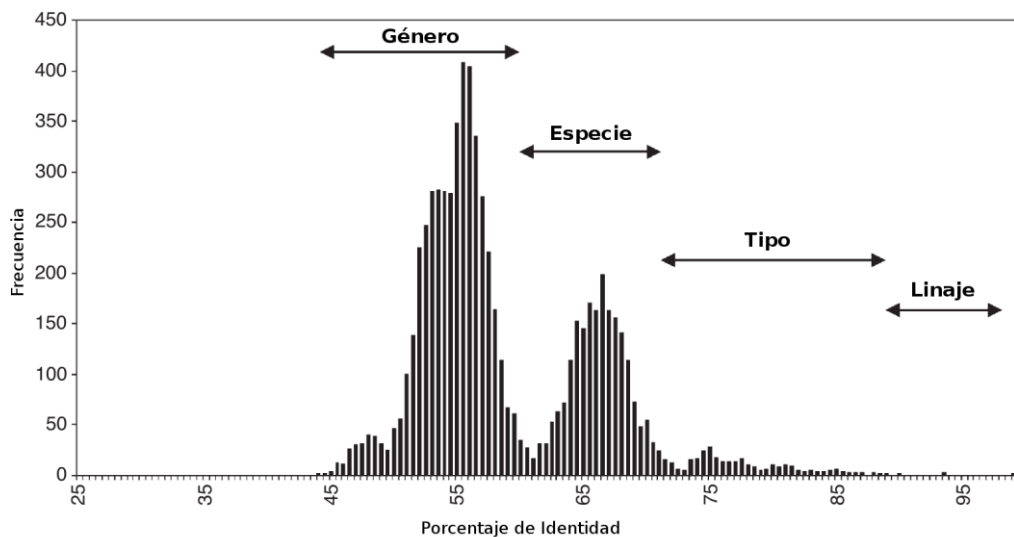


Fig. 8. Distribución de frecuencias de porcentajes de identidad de secuencias nucleotídicas de L1 (comparación pairwise) de 118 tipos de Papillomavirus. Adaptado de (de Villiers et al., 2004).

Ya que muchos genotipos no pueden ser distinguidos biológicamente de forma sencilla, el Comité Internacional de Taxonomía Viral no ha aceptado estos tipos como especies diferenciadas. Por lo tanto el término “especies” se reserva a las asociaciones filogenéticas de múltiples genotipos de VPH dentro de un determinado género que muestran un 60–70 % de identidad en la secuencia de la región L1 y una similitud biológica considerable.

Los parámetros para clasificar aislados relacionados de un determinado genotipo se basan actualmente en el análisis de una gran base de datos con los genomas completos de

aislamientos de VPH de la especie alfa-9 (VPH16, VPH31, VPH33, VPH35, VPH52, VPH58, VPH67). La comparación de estos genomas utilizando el método *pairwise* (por parejas) reveló al menos tres categorías discretas de relación sugiriendo una taxonomía natural (linajes). El examen previo de filogenias para cada tipo alfa-9 combinado con un umbral aproximado del 1 % de diferencias en el genoma completo fue utilizado para definir linajes mayores. Las diferencias entre genomas en el rango del 0.5-1 % se designaron como sublinajes. El análisis filogenético confirmó la descripción de cuatro linajes mayores de VPH16 (Burk *et al.*, 2013) y nueve sublinajes; en el caso de VPH18 se describen otros tres linajes y ocho sublinajes (Burk *et al.*, 2013) (tabla 2).

Tabla 2. Linajes y sublinajes descritos para VPH16 y VPH18. Adaptado de (Burk *et al.*, 2013).

GENOTIPO VPH	LINAJE	SUBLINAJE	GENOMA DE REFERENCIA	DENOMINACIONES PREVIAS
VPH16	A	A1	Ref	européo (E)
		A2	W0122	européo (E)
		A3	AS411	européo (E)
		A4	W0724	asiático (As)
	B	B1	W0236	africano 1a (Afr1a)
		B2	Z109	africano 1b (Afr1b)
	C		R460	africano 2a (Afr2a)
	D	D1	QV00512	norteamericano (NA)1
		D2	QV15321	asiático-americano (AA)2
		D3	QV00995	asiático-americano (AA)1
VPH18	A	A1	Ref	asiático-americano (AA)
		A2	Qv16306	asiático-americano (AA)
		A3	Qv15586	européo (E)
		A4	Qv02876	européo (E)
		A5	CU11	européo (E)
	B	B1	Qv04924	africano 1 (Af1)
		B2	BF172	africano (Af)
		B3	Qv17199	africano 2 (Af2)
	C		Qv39775	africano (Af)

Profundizando en las diferencias encontradas en el genotipo 16, destaca que todos los indels se encontraron en la región altamente variable no codificadora situada entre E5 y L2. Se han encontrado 540 SNPs diferentes en total y un máximo de 180 diferencias al comparar cualquier par de secuencias entre sí (2.3 % del genoma). La característica que más llama la atención es que la heterogeneidad genética se concentra en los linajes no europeos (B/C/D). Además de las diferencias entre linajes parece haber una estructura de sublinajes,

especialmente bien desarrollada en el linaje D, lo que sugiere un nivel evolutivo más profundo que los cuatro linajes reconocidos. Es destacable la pérdida de resolución entre linajes y sublinajes cuando solo se compara la secuencia de L1. Esta observación supone un ejemplo concreto del uso del genoma completo de los VPH para definir linajes, mientras que la secuencia del ORF L1 es suficiente y robusta para distinguir entre genotipos de VPH.

1.3.3 Coevolución de VPH y especie humana. Linajes de VPH16 y VPH18

Hay evidencia de que VPH pertenece al grupo de virus que parecen haber infectado a los humanos directamente, desarrollando raíces filogenéticas profundas en ancestros prehumanos y coevolucionando con los humanos, ya que no se ha encontrado ningún VPH en otra especie animal ni ningún VP animal se ha encontrado infectando en humanos.

Los linajes de cada genotipo de VPH a menudo se agrupan en partes específicas del mundo y se correlacionan con la distribución de grandes grupos étnicos humanos. En el caso del VPH16, se encuentran representantes de todos sus linajes en toda la población mundial pero su contribución relativa difiere según la geografía y la etnia.

Los árboles filogenéticos de VPH16 y VPH18 inicialmente se basaban en las secuencias del LCR, pero han sido recientemente confirmados por la secuenciación del genoma completo. Estos estudios han puesto en evidencia que el incremento en la prevalencia de linajes específicos en una población dada no puede ser explicado únicamente por cuellos de botella durante el establecimiento de una población portadora sino también por una selección positiva de rasgos genéticos. En América del Norte, Central y del Sur, a menudo se observan varios linajes de ambos genotipos que reflejan patrones de inmigración dentro de estos países.

Dado que muchas de estas sociedades multiétnicas se originaron entre uno y cinco siglos atrás, los contactos sexuales interétnicos y la mezcla racial deberían haber dado lugar a una distribución homogénea de los diferentes linajes entre los diferentes segmentos étnicos de cada sociedad. Sorprendentemente, todavía hay una cierta asociación preferencial entre

linajes específicos de VPH16 y VPH18 y algunas etnias aunque esto podría explicarse por una preferencia sexual intraétnica.

1.3.4 Manifestaciones clínicas de genotipos

Los genotipos específicos de VPH tienden a mostrar tropismo por determinados tejidos. Según el tipo de epitelio que infectan, nos referimos a los genotipos de VPH como cutáneos o mucosos -según infecten al epitelio queratinizante o al no queratinizante- y aquellos relacionados con una enfermedad autosómica recesiva rara denominada epidermodisplasia verruciforme (EV). Los VPH que infectan células epiteliales de mucosa pertenecen al género Alfa, mientras que los que infectan células epiteliales cutáneas pueden pertenecer a cualquiera de los cinco géneros. También pueden ser agrupados según las áreas del cuerpo donde producen infección: región oral, anogenital o piel.

Los genotipos cutáneos se encuentran comúnmente en lesiones de piel como verrugas benignas, queratosis actínica, cánceres de piel no melanoma y queratoacantomas. Estos genotipos también se detectan comúnmente en piel sana.

Los genotipos mucosos pueden causar lesiones benignas o malignas. En 2009, un grupo de trabajo de la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) clasificó doce genotipos mucosos (VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58 y VPH59) como carcinogénicos para humanos (grupo 1) por su asociación con el cáncer cervical y por lo tanto se consideran como de alto riesgo (VPH-AR) (Bouvard *et al.*, 2009). Estos genotipos se agrupan en una misma rama evolutiva llamada clado de alto riesgo que incluye especies de *Alfapapillomavirus* de los grupos 5, 6, 7, 9 y 11 (tabla 3). Diez tipos adicionales de este clado fueron clasificados como posibles carcinógenos (grupo 2B: VPH26, VPH53, VPH64, VPH65, VPH66, VPH67, VPH69, VPH70, VPH73, VPH82) basándose en su relación filogenética con los genotipos del grupo 1, y otro más del mismo clado (VPH 68) fue valorado como probable carcinógeno por su especial riesgo (grupo 2A). Otros genotipos

mucosos en el género Alfa como los VPH6 y VPH11 pueden causar condilomas genitales benignos.

En la tabla 3 se muestran los genotipos de VPH más frecuentemente asociados con cada manifestación clínica en particular.

Tabla 3. Genotipos de VPH más frecuentemente asociados a cada manifestación clínica en particular. Adaptado de (Cubie, 2013).

MANIFESTACIÓN CLÍNICA		GENOTIPOS DE VPH MÁS FRECUENTEMENTE ASOCIADOS
Verrugas comunes		VPH2, 4, 7; ocasionalmente otros tipos en inmunosuprimidos (p. ej. VPH75–77)
Verrugas planas lisas		VPH3, 10, ocasionalmente VPH26–29, 41
Verrugas plantares		VPH1, 2, 4
Epidermodisplasia verruciforme	Verrugas planas	VPH3, 10
	Placas similares a pitiriasis	VPH5, 8; menos comúnmente VPH 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21–25, 36–39, 47, 49
	Carcinoma de células escamosas de piel expuesta al sol	VPH5, 8, menos comúnmente VPH 14, 17, 20, 47
Verrugas anogenitales	Verrugas externas	VPH6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89
	Tumor Buschke–Lowenstein	VPH6
	Papulosis bowenoide	VPH16, 55
Neoplasia y preneoplasia anogenital	Grupo 1: carcinógeno humano	VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
	Grupo 2A: probable carcinógeno humano	VPH68
	Grupo 2B: posibles carcinógenos humanos	VPH26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82
Lesiones orales	Papilomas orales	VPH2, 6, 7, 11, 16, 18, 32, 57
	Papilomas laríngeos	VPH6,11
	Hiperplasia focal (enfermedad de Heck's)	VPH13, 32
	Carcinoma orofaríngeo	VPH16 predominantemente, VPH18

Los VPH-AR se asocian con diversos tipos de neoplasia intraepitelial anogenital: cervical, vulvar, vaginal, anal o de pene. Tanto los carcinomas de células escamosas como los cánceres de piel no melanoma son dos de los cánceres más prevalentes entre la población caucásica mundial.

1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y FACTORES DE PROGRESIÓN

1.4.1 Detección de ADN viral y genotipado

El cultivo celular no es aplicable al diagnóstico clínico de la infección por VPH, por lo que se han desarrollado numerosos ensayos para detectar ácidos nucleicos de VPH en muestras cervicales. La principal ventaja de detectar ADN de VPH es su elevada sensibilidad con el consecuente elevado valor predictivo negativo. El único problema es su baja especificidad, sobre todo en mujeres jóvenes donde la prevalencia es elevada, debido al hecho de que no puede diferenciar entre infección transitoria o persistente. Sin embargo estudios de cohortes y ensayos clínicos aleatorizados han demostrado que la detección de VPH-AR es muy sensible y muy específica para la detección de CIN de grado 2 o peor (CIN2+) en mujeres de 30 años o mayores y para el diagnóstico de adenocarcinoma, teniendo en cuenta que los precursores del adenocarcinoma a menudo no se detectan mediante métodos citológicos.

Hay un amplio rango de ensayos de detección de ADN de VPH (muchos de ellos en el mercado) basados en diferentes técnicas como amplificación de la diana (principalmente PCR), amplificación de la señal y amplificación mediante sondas. Generalmente amplifican la región conservada del gen de la proteína mayor de la cápside (L1) utilizando cebadores consenso.

El genotipado de VPH16 y VPH18, debido a su especial carcinogenicidad, ha sido incluido en las guías americanas para la selección de mujeres con citología negativa pero detección positiva de ADN de VPH.

Las Fuerzas Especiales de los Servicios Preventivos de Estados Unidos (USPSTF) y la asociación multidisciplinar entre la Sociedad Americana del Cáncer, la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical y la Sociedad Americana de Patología Clínica (ACS/ASCCP/ASCP) así como diversas autoridades sanitarias europeas (HTA -Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias- Italia y el Consejo de Salud de Holanda) han

recomendado los ensayos de detección de ADN de VPH como método de cribado primario de cáncer cervical.

Numerosos ensayos clínicos controlados aleatorios (Bulkmans *et al.*, 2007; Kitchener *et al.*, 2009; Mayrand *et al.*, 2007; Naucler *et al.*, 2007) han establecido claramente que las pruebas de detección de ADN de VPH-AR son significativamente más sensibles que la citología de Papanicolaou en el diagnóstico de CIN2+. Sin embargo, como la infección por VPH es en la mayoría de los casos un evento transitorio, un cribado basado exclusivamente en la prueba de ADN del VPH causaría un número excesivo de colposcopias. Por esta razón, es necesario seleccionar con otro marcador aquellas mujeres que con una detección de ADN de VPH presenten un alto riesgo de progresión a CIN2+. La detección de ADN de VPH-AR con citología posterior en los casos positivos ha demostrado ser una estrategia rentable.

Otras opciones de selección tras una detección de ADN de VPH-AR incluyen referir a las mujeres a colposcopia en caso de detección de ciertos genotipos concretos- VPH16 y/o VPH18 (y/o VPH31, VPH33, VPH45)- independientemente del resultado de la citología (Rijkaart *et al.*, 2012).

1.4.2 Detección de ARN viral

La necesidad de marcadores específicos de progresión tiene cada vez más relevancia hoy en día. La diana más prometedora de los marcadores de progresión es la expresión del oncogén viral E6/E7. Puede vigilarse a través de la detección de transcritos de ARNm o proteínas E6/E7 virales, o indirectamente a través la detección de ciertas proteínas del huésped como p16.

Estos ensayos están diseñados para detectar ARNm viral codificador para las proteínas E6 y E7, que son los factores más críticos para el desarrollo del cáncer cervical. La sobreexpresión de ARNm viral codificador para estas proteínas ha sido evaluada como marcador de la transición de infección productiva a infección abortiva promoviendo la transformación celular. Actualmente están disponibles cuatro ensayos para la detección de ARNm de E6/E7 en

muestras cervicales. Los ensayos APTIMA® HPV (Hologic) y HPV OncoTect™ (inCellDx) se basan en RT-PCR y detectan catorce y trece genotipos de alto riesgo respectivamente. Los ensayos PreTect® HPV-Proofer (Norchip) y NucliSENS EasyQ® HPV (Biomerieux) se basan en la tecnología de amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y detectan los cinco genotipos más comunes en cáncer cervical (VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH45).

En la selección de mujeres con ASC-US o LSIL que deben derivarse a colposcopia, la prueba de ARNm es más específica que la repetición de la citología (Sørbye *et al.*, 2011; Szarewski *et al.*, 2012, 2008). La prueba de ARNm también es más específica que la repetición de la citología en el seguimiento tras colposcopia de mujeres con biopsia cervical negativa (Sørbye *et al.*, 2011). Otros nuevos candidatos podrían ser la detección de micro-ARNs, que son pequeños ARN de cadena sencilla no codificadores que regulan la expresión celular de los genes y que podrían estar implicados en la patogénesis de diversos cánceres humanos.

1.4.3 Detección de proteínas celulares

La sobreexpresión de p16INK4a, una proteína supresora de tumores que provoca una retroalimentación negativa en la inactivación funcional de la proteína Rb por la proteína E7 del VPH, puede ser considerada como un marcador de infección por VPH o de expresión activada de oncogenes virales y de desregulación del ciclo celular inducida por el virus. La expresión histoquímica de p16INK4a se ha asociado positivamente con el grado de displasia en el epitelio escamoso cervical. Además la sobreexpresión de p16INK4a ha mostrado que es un marcador útil de CIN2 o para predecir progresión a CIN2 en los 3 años siguientes en mujeres con detección de VPH, especialmente aquellas con edad entre 35 y 60 años (Carozzi *et al.*, 2013).

Ki-67 es una proteína no histona expresada en el núcleo durante todo el ciclo celular, excepto en las fases tempranas G0 y G1. Por lo tanto constituye un marcador eficaz de proliferación celular. Ha sido asociado con un grado creciente de displasia cervical y se considera un marcador pronóstico adicional en el cáncer cervical. Está presente en las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero está ausente en las células en reposo. En

diversos estudios se ha demostrado que la detección del antígeno de proliferación celular Ki-67 es un indicador fiable de la fracción de crecimiento de un tumor. La codetección de p16INK4a y de Ki-67 se observa únicamente en lesiones displásicas.

1.4.4 Linajes de VPH16 y VPH18

La contribución de los diferentes linajes virales de genotipos de alto riesgo oncogénico al desarrollo de cáncer podría estar relacionada con diferencias en su infectividad, es decir en la adquisición de infección tras exposición al virus, y con diferencias en su persistencia a largo plazo (más de 1-2 años). También podría estar relacionada con las diferencias que puedan presentar las células infectadas por VPH en su capacidad de invasión.

Ningún estudio hasta ahora ha evaluado la infectividad relativa de los diferentes linajes virales, pero hay evidencia creciente de que los linajes de VPH16, VPH31, VPH52 y VPH58 tienen diferentes propiedades oncogénicas.

1.4.5 Linajes de VPH16 y patogénesis cervical

En el caso de VPH16, los linajes no europeos podrían persistir 2 veces más que los europeos (Schiffman *et al.*, 2010; Villa *et al.*, 2000) aunque este efecto podría verse afectado por la genética del hospedador (Xi *et al.*, 2006). En la población europea, donde predomina el linaje europeo, la variación de VPH16 europeo-T350G mostró 2 veces más riesgo de persistencia (Cornet *et al.*, 2013; Gheit *et al.*, 2011).

Los linajes no europeos mostraron 2-4 veces más riesgo de neoplasia cervical en general y de CIN3-CIS en concreto, que el linaje europeo (Hildesheim and Wang, 2002; Schiffman *et al.*, 2010; Sichero *et al.*, 2007; Villa *et al.*, 2000; Xi *et al.*, 2007; Zuna *et al.*, 2009). En cuanto a su distribución en poblaciones específicas, en Taiwán el linaje asiático (A4) se relacionó con un riesgo 10 veces mayor de CIN de grado 3 o peor (CIN3+) que el linaje europeo (A1). Este estudio demostró que dentro de un linaje específico puede haber marcadores genéticos virales específicos como se ha sugerido para el linaje asiático-americano (D2, D3) (Smith *et al.*, 2011).

Existe una fuerte evidencia de que los linajes no europeos tienen un elevado riesgo de cáncer aunque en muchos estudios el efecto observado se relaciona con el riesgo aumentado de un linaje concreto, el linaje D (Berumen *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2003; Zuna *et al.*, 2009) y parece existir una alta complejidad geográfica (Cornet *et al.*, 2013). También existen múltiples estudios que indican que el linaje D en comparación con el linaje europeo (A1, A2, A3) se asocia desproporcionadamente (4-35 veces más riesgo) con el adenocarcinoma vs. el carcinoma escamoso (Berumen *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2003; Quint *et al.*, 2010; Zuna *et al.*, 2009). Sin embargo un estudio de cáncer en mujeres indonesias, surinamesas y alemanas no corroboró este hallazgo (de Boer *et al.*, 2004).

1.4.6 Linajes de VPH18 y patogénesis cervical

Probablemente debido a que es mucho menos prevalente que el VPH16, existe una falta de evidencia del papel de los linajes de VPH18 en los diferentes aspectos de la patogénesis.

Hay trabajos con resultados discordantes de si los linajes no africanos (europeo y asiático-americano, A) o el linaje africano (B, C) están asociados con persistencia (Schiffman *et al.*, 2010; Sichero *et al.*, 2007). Una variante de confusión en estos análisis podría ser el maquillaje genético del hospedador (Xi *et al.*, 2006).

Hay pocos estudios de su influencia en evolución al precáncer, en parte debido a que este genotipo se detecta infrecuentemente asociado al precáncer si se compara con su asociación al cáncer (Guan *et al.*, 2012; Xi *et al.*, 2006). Al menos un estudio indica que los linajes no africanos (A) presentan en comparación con el linaje africano (B, C) un riesgo acumulado a dos años de incidencia de CIN3-CIS (Xi *et al.*, 2007) aproximadamente 2 veces mayor.

No existe evidencia de que los diferentes linajes estén asociados con riesgo de cáncer pero uno de tres estudios sugieren que el linaje asiático-americano (A1/A2) es 4 veces más común en adenocarcinoma que el linaje europeo (A3/A4) (Arias-Pulido *et al.*, 2005; Burk *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2005).

1.5 FACTORES AMBIENTALES Y CÁNCER CERVICAL

La persistencia de la infección por el VPH, el genotipo de VPH, la infección con múltiples genotipos de VPH, si el ADN viral está presente de forma episomal o integrado y la cuantía de la carga viral celular pueden ser factores importantes en el desarrollo del cáncer. Igualmente importantes pueden ser otros cofactores que pueden variar de un individuo a otro, como el estado inmunológico, el estado nutricional, el consumo de tabaco y la coinfección con otros agentes de transmisión sexual, incluido el VIH y el virus del herpes simple.

En resumen, en la evolución de la infección por el VPH podrían influir factores tanto virales como genéticos del huésped o ambientales.

1.6 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

El tratamiento de las lesiones no invasivas se realiza generalmente por técnicas destructivas o técnicas de exéresis de la zona de transformación:

- Técnicas destructivas: utilizadas exclusivamente en caso de CIN1.
 - Criocoagulación.
 - Vaporización con láser.
 - Cauterización fría.
- Técnicas de exéresis (conización):
 - Asa electroquirúrgica (LLETZ) que emplea corriente eléctrica de radiofrecuencia para cortar tejidos por vaporización o coagularlo por deshidratación.
 - Bisturí, láser, electrocauterización diatérmica radical.

El tratamiento del cáncer de cérvix invasivo puede incluir cirugía, radioterapia o una combinación de ambas. El tratamiento y pronóstico dependen del estadio. Varios estudios clínicos han demostrado una tasa de supervivencia a cinco años alta (>75 %) para el estadio I, aunque declina rápidamente conforme avanzan los estadios (<10 % en el estadio IV).

El conocimiento de la historia natural de la infección por VPH y su relación con el desarrollo del cáncer cervical ha permitido la incorporación de dos nuevas estrategias preventivas: la vacunación frente a VPH en la prevención primaria y la mejora del cribado mediante la incorporación de la detección de VPH en la prevención secundaria.

1.6.1 Prevención primaria

La infección por VPH se transmite por contacto sexual y muchas mujeres sexualmente activas se infectan con este virus. Solo el 50-60 % de las mujeres desarrollan anticuerpos tras la infección natural por VPH16 o VPH18 y, además, estos anticuerpos por sí solos pueden no proporcionar protección completa frente a la reinfección tipo-específica. Tampoco se sabe si la detección de estos anticuerpos es específica o crítica para la duración de la protección natural.

La administración de las vacunas actualmente disponibles frente a VPH, Gardasil®/Silgard® (Merck & Co., Whitehouse Station, New Jersey, EUA) y Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) antes de la exposición al virus es casi 100 % efectiva frente a los tipos incluidos en las formulaciones.

Cualquiera de las dos vacunas son vacunas de subunidades no infecciosas compuestas primariamente por VLPs. Aunque conceptualmente son similares, ambas vacunas difieren en varios aspectos: genotipos incluidos, dosis, sistema de producción y adyuvante utilizado (tabla 4).

Tabla 4. Características de las vacunas frente a VPH. Traducción de (Schiller et al., 2012).

	Gardasil®	Cervarix®
Fabricante	Merck & Co	GlaxoSmithKline Biologicals
Tipos VLP	6/11/16/18	16/18
Dosis de Proteína L1	20/40/40/20 µg	20/20 µg
Células Productoras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> expresando L1	Línea celular (Hi 5) de insecto <i>Trichoplusia ni</i> infectada con baculovirus L1 recombinante
Adyuvante	225 µg aluminio hidroxifosfato sulfato	500 µg aluminio hidróxido, 50 µg 3-O-deacilato-4'-monofosforil lípido A
Calendario de Administración	0, 2, 6 meses	0, 1, 6 meses

La eficacia de estas vacunas concretamente en preadolescentes y adolescentes tempranas, la población diana primaria de la vacunación, no ha sido demostrada. Sin embargo, dados los resultados de efectividad en adultas vacunadas y la fuerte inmunogenicidad observada en adolescentes, las expectativas de que los hallazgos serán favorables son elevadas.

Ambas vacunas proporcionaron una protección significativa frente a ciertos genotipos relacionados con VPH16 (globalmente menor del 30 %). Cervarix® también demostró protección frente a ciertos genotipos relacionados con VPH18 y, especialmente, frente a VPH45. Evidencias derivadas del seguimiento a largo plazo del ensayo en fase II b de Cervarix® sugiere que la protección cruzada podría disminuir con el tiempo. La proporción de mujeres de entre 12-26 años diagnosticadas con verrugas genitales disminuyó en un 73 % en los tres primeros años desde la introducción de la vacuna. También se observó un descenso del 25 % en los hombres heterosexuales, pero ninguno en hombres que tienen sexo con hombres. Ya que los hombres no fueron incluidos en el programa de vacunación, esto sugiere un impacto de inmunidad de grupo. También se pudieron observar descensos en la prevalencia de lesiones cervicales precancerosas.

Varias vacunas de segunda generación están siendo desarrolladas con el objetivo de solventar algunas de las limitaciones de las vacunas actuales. La propuesta más avanzada es

simplemente aumentar la valencia de una vacuna VLP L1 para conseguir protección frente a más genotipos. También se están investigando alternativas de producción para abaratar el coste. Desde el año 2006, ambas vacunas se han aprobado en más de 100 países a lo largo del mundo y al inicio de 2012 se habían introducido programas nacionales de vacunación en al menos 39 países. La población diana son niñas adolescentes y algunos programas permiten llegar a incluir mujeres de grupos de edad mayores. En España la vacuna fue introducida en el programa de inmunización nacional en 2007. La vacunación frente a VPH podría tener su mayor impacto en países con bajos o medianos recursos, donde más del 80 % de los nuevos cánceres cervicales ocurren y donde los programas de cribado de cáncer cervical no existen o son limitados. Sin embargo tras los primeros 5 años, pocos países fuera de Norteamérica, Oceanía y Europa han implementado estos programas, principalmente por limitaciones presupuestarias.

Aunque se han observado ciertos eventos específicos adversos, estos no son muy frecuentes.

Deberán tomarse en el futuro inmediato nuevas decisiones tanto sobre la vacunación en hombres como sobre la utilización de dos dosis vacunales en lugar de las tres de la pauta vacunal actual o sobre la incorporación de vacunas de segunda generación. En Galicia se recomiendan actualmente dos dosis en la vacunación de niñas adolescentes.

1.6.2 Prevención secundaria

Impacto del cribado

El impacto del cribado poblacional se refleja en una reducción sustancial de la incidencia de cáncer cervical en los últimos 50 años en los países con programas establecidos de cribado basados en citología. Sobre todo, los programas de calidad garantizada han demostrado ser muy eficaces. Sin embargo, el cribado cervical basado en la citología también tiene algunas limitaciones. El principal problema es la baja sensibilidad de un solo frotis para detectar lesiones precursoras de alto grado (50-70 %), por lo que se requieren pruebas frecuentes.

Además, la citología tiene baja reproducibilidad, lo que lleva a una precisión variable. Por otra parte, mediante la repetición de la citología, el número de falsos positivos aumenta sustancialmente con el tiempo.

Varios estudios longitudinales aleatorizados han demostrado una mejoría en la prevención de CIN de alto grado y cáncer cervical con la introducción de la detección de VPH en el cribado cervical.

Existen tres posibles aplicaciones clínicas de la detección de VPH-AR (Arbyn *et al.*, 2012):

A) Cribado de mujeres con anomalías citológicas de bajo grado:

En el cribado basado en la citología, ante un hallazgo de ASC-US, el uso de la determinación de VPH para determinar qué pacientes se deberían derivar a colposcopia por su riesgo de CIN2+, tiene mayor sensibilidad con una especificidad similar en comparación con la repetición de la citología.

B) Seguimiento del tratamiento por CIN de alto grado para evitar recurrencias:

La tasa de CIN de alto grado recurrente o residual, evaluado antes de los dos años o después, varía del 4-18 %, con una media del 8 %. El riesgo de CIN2+ recurrente es mayor en mujeres mayores de 50 años, lo que es consecuente con la observación de que la persistencia viral incrementa con la edad. Las mujeres que han sido tratadas por CIN tienen un riesgo incrementado de cáncer cervical invasivo comparado con la población general durante al menos 10 años, e incluso hasta 20 años después del tratamiento.

Sería particularmente útil el encontrar un marcador que predijese la evolución favorable, permitiendo acortar el período de seguimiento.

C) Cribado primario de (pre)cáncer cervical:

En mujeres de 30 años o mayores, con la detección del VPH-AR, diversos estudios han demostrado una reducción significativa en el riesgo de CIN3+ e incluso de cáncer en comparación con el cribado citológico.

La citología, el genotipado de VPH16 o VPH16/VPH18, combinaciones de genotipado VPH16/VPH18 y citología o la repetición de la determinación de VPH para detectar infecciones persistentes también estratifican el riesgo de CIN3+ y podrían ser utilizados en la selección de mujeres VPH-AR positivas que deberían ser derivadas a colposcopia.

Otros marcadores candidatos podrían ser la detección de ARNm o la doble tinción p16INK4a/Ki67 pero la evidencia para apoyar su uso es todavía insuficiente. Actualmente no existe ningún marcador o combinación de marcadores que permitan realizar una selección adecuada de mujeres VPH positivas. Por ello, en las mujeres VPH-AR positivas con citología o VPH16/VPH18 negativos se debería continuar el seguimiento y repetir el cribado.

Cribado en Galicia (2008-2014)

En el caso particular de Galicia se introdujo un protocolo para el cribado del cáncer cervical en 2008 siguiendo recomendaciones europeas y nacionales. Se trata de un cribado oportunista para mujeres entre 21 y 65 años basado en la citología. Este protocolo fue actualizado en el año 2013, introduciendo la detección de ADN de VPH en mujeres con ASC-US a partir de los 21 años de edad.

2 OBJETIVOS

En septiembre de 2008 se introdujo en Galicia la vacunación gratuita de las niñas a los 14 años frente a VPH16 y VPH18 con la vacuna bivalente. La implementación de cualquier nueva intervención requiere una vigilancia en la población general para poder medir su eficacia. Se espera que el impacto de la vacunación en la incidencia del cáncer cervical tarde varias décadas en manifestarse. Disponer de datos de prevalencia basal de genotipos de VPH en lesiones precancerosas y cancerosas es esencial para poder realizar comparaciones futuras que permitan evaluar el impacto de los protocolos de cribado y vacunación en la prevención del cáncer cervical y permite considerar nuevos genotipos en el desarrollo de nuevas vacunas. Con estos enunciados, se realizó un primer estudio retrospectivo con los siguientes objetivos:

- Conocer la prevalencia de VPH en casos confirmados histológicamente de CIN2+ antes de la introducción de la vacunación gratuita.
- Conocer la distribución del genotipo 16 en las lesiones escamosas de grado 2 o peor.
- Conocer el impacto esperado de la vacunación bivalente en la prevalencia de lesiones cervicales.

La prevalencia de los VPH-AR es elevada en la población general. Las razones que favorecen que solo una pequeña parte de estas infecciones persista y cause lesiones cancerosas todavía se desconocen. La asociación entre el VPH16 y VPH18 y el cáncer cervical está estrechamente relacionada con la composición específica de su genoma. Determinadas sustituciones nucleotídicas características de ciertos linajes de estos genotipos podrían alterar su potencial oncogénico aunque podría existir cierta complejidad geográfica. En este sentido, se diseñó un segundo estudio de casos y controles con los siguientes objetivos:

- Conocer la prevalencia local de linajes de VPH16 y VPH18 en Galicia.

- Determinar la asociación de los diferentes linajes de VPH16 y VPH18 con las lesiones cervicales de alto grado.

Varios estudios han mostrado que la infección por la variante europea L83V del VPH16, con una sustitución nucleotídica en el gen E6 (E6-T350G) es un factor de riesgo de enfermedad cervical avanzada aunque se han encontrado algunos resultados discrepantes. La detección de esta variante se ha realizado principalmente mediante secuenciación tradicional de Sanger pero recientemente se ha sugerido que otros métodos como la pirosecuenciación o el análisis de curvas de fusión de alta resolución también podrían utilizarse. Teniendo en cuenta estas premisas, se abordó un tercer estudio retrospectivo con los siguientes objetivos:

- Determinar el límite de sensibilidad, el rango de detección y la capacidad de discriminación de un nuevo método de discriminación alélica mediante amplificación genómica de desarrollo propio para la detección de la mutación T350G del VPH16.
- Calcular la concordancia de este nuevo método con el método de referencia (secuenciación de ácidos nucleicos). Evaluar su idoneidad para el tipado de VPH según los criterios de la red de laboratorios de VPH de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Conocer la distribución de esta mutación en un grupo de mujeres con lesiones cervicales relacionadas con VPH16.

La detección de ARNm de VPH podría ser más eficiente que la citología para la selección de mujeres con ADN de VPH positivo candidatas a colposcopia. NucliSENS EasyQ® HPV v1.1 (NucliSENS EasyQ; Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia) es una prueba basada en la detección de ARNm E6/E7 tipo específico de VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH45. La detección de ARNm de estos cinco genotipos es más específica que otras pruebas comerciales disponibles de detección de ARNm de VPH. Algunos estudios han sugerido que las diferencias en la

exactitud diagnóstica de este ensayo podría atribuirse más al número limitado de genotipos detectados y a la menor sensibilidad analítica que a la amplificación específica del ARNm viral pero en otro estudio ha mostrado mayor especificidad y mayor VPP en la predicción de CIN2+ que una prueba de ADN del VPH positivo para los mismos cinco genotipos. Con el fin de comprobar qué estudios tenían más fiabilidad, se realizó un cuarto proyecto prospectivo con el siguiente objetivo:

- Evaluar la eficacia del ensayo NucliSENS EasyQ en la predicción de CIN2+ en el caso de detección de ADN de VPH16 y/o VPH18 en mujeres con y sin lesiones cervicales.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

La población de estudio la constituyeron mujeres que acudieron de forma rutinaria a las consultas de los servicios de Ginecología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo y/o de Ourense durante los años 2006-2013 para la detección precoz de cáncer de cérvix.

- En el caso del primer estudio se incluyeron de forma retrospectiva 94 mujeres no vacunadas diagnosticadas de CIN2+ entre los años 2009 y 2010 en el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.
- En el caso del segundo estudio se llevó a cabo un estudio prospectivo de casos y controles de dos años de duración en los Complejos Hospitalarios Universitarios de Vigo y Ourense. Durante los años 2009-2010, muestras de 4 058 mujeres se procesaron para detectar la presencia de VPH en los servicios de Microbiología de estos dos hospitales. Se detectó presencia de VPH-AR en 1 644 mujeres. Se ofreció participar en este estudio a mujeres con detección de VPH16 y/o VPH18; 287 de 658 mujeres VPH16/VPH18-positivas fueron incluidas. También se incluyeron 109 casos adicionales de CIN2+ positivos para VPH16 diagnosticados entre los años 2006-2008 y 2011-2012 en el mismo servicio del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo. Los criterios para la asignación de casos y controles fueron los siguientes:
 - Caso: diagnóstico histológico de CIN2+ al inicio del estudio o durante el período de seguimiento clínico.
 - Control: no persistencia viral o persistencia viral sin progresión clínica a CIN2+ durante el período de seguimiento clínico.
- En el caso del tercer estudio:
 - Para determinar el límite de sensibilidad, el rango de detección y la capacidad de discriminación de la técnica se utilizaron amplificadores

cuantificados de la región LCR-E6 de VPH16 T350G, T350 y mezclas de ambos.

- Para conocer su concordancia con el método de referencia se utilizó un panel de 102 muestras que habían sido caracterizadas previamente en el segundo estudio mediante secuenciación de ácidos nucleicos.
 - Para establecer si el ensayo era idóneo para el tipado de VPH, se evaluó un panel de 43 muestras de composición desconocida enviado por la red de laboratorios de VPH de la OMS (Organización Mundial de la Salud) como parte del estudio de idoneidad del año 2010.
 - Para conocer la distribución de esta mutación en CIN2+, se incluyeron de forma retrospectiva 32 casos positivos para VPH16 diagnosticados durante los años 2006-2010.
- En el caso del cuarto estudio se incluyeron de forma prospectiva 165 mujeres con detección de VPH16 y/o VPH18 durante los años 2009-2012 en el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.

Las muestras para la realización de citología y la detección de ADN de VPH al inicio del estudio fueron obtenidas en un intervalo máximo de 4 meses.

3.1.1 Seguimiento clínico

En el caso de los estudios que incluyeron una fase de seguimiento clínico (estudios segundo y cuarto), los criterios de inclusión fueron una edad mayor de 18 años, y que no hubiesen recibido tratamiento por lesiones cervicales en el año anterior. En el caso de las pacientes incluidas en el segundo estudio:

- Se realizó colposcopia en caso de detección concomitante de ASC-US y ADN de VPH-AR o en caso de diagnóstico citológico de ASC-H, AGUS, LSIL, HSIL o carcinoma. La colposcopia dirigió la toma de biopsias endocervicales.

- En caso de que el resultado de la citología fuese negativo para lesión intraepitelial o malignidad, o de que las biopsias colposcópicas no detectasen CIN2+, se tomaron muestras para citología y detección de ADN de VPH cada 6 meses durante un máximo de 24 meses.

En el caso de las pacientes incluidas en el cuarto estudio:

- Si la citología basal fue negativa para lesión intraepitelial o malignidad se tomaron muestras para citología y detección de ADN de VPH cada 6 meses durante un máximo de 18 meses.
- Si la citología basal fue ASC-US, AGUS, ASC-H, LSIL o HSIL, se realizó colposcopia en un intervalo máximo de 7 meses, interrumpiéndose entonces el seguimiento.

En el caso de mujeres incluidas en los estudios segundo y cuarto:

- En las pacientes que no progresaron a CIN2+, se interrumpió el seguimiento antes del período establecido en los dos casos siguientes:
 - Negativización de VPH junto a dos citologías consecutivas negativas.
 - Las pacientes fueron sometidas a técnicas de destrucción para el tratamiento de CIN1 (crio-coagulación o láser).
- En las pacientes que progresaron a CIN2+, se realizó exéresis de las lesiones y control postratamiento mediante citología y ADN de VPH a los 6 meses y al año. En caso de que la lesión contactase con los bordes endocervicales en el examen histológico del fragmento conizado, el primer control se adelantó a los 4 meses postratamiento.
- En caso de embarazo la toma de muestras se discontinuó hasta 4 meses tras el parto.

3.1.2 Datos epidemiológicos

Se tomaron los datos de edad de la paciente al inicio del estudio y en la fecha del diagnóstico de CIN2+ o CIN3+.

A las mujeres participantes en el primer y segundo estudio se les dio la oportunidad de responder a una encuesta voluntaria autorellenable en la que se preguntaba su raza y nacionalidad, consumo de anticonceptivos orales o tabaco, edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas sexuales a lo largo de su vida y parejas extranjeras. También se les ofreció la posibilidad de realizar una serología de VIH.

3.1.3 Comité de ética

Todas las mujeres firmaron un consentimiento informado para su participación en el estudio. Este estudio recibió la aprobación del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (Santiago de Compostela). Todas las participantes fueron informadas acerca del propósito del estudio y se les pidió que firmasen un consentimiento antes de tomar parte en el estudio. Se aseguró la confidencialidad durante la recopilación de datos y la publicación de resultados.

3.2 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO E HISTOLÓGICO

El resultado de la citología se expresó mediante la nomenclatura Bethesda (Solomon *et al.*, 2002).

La histología se consideró como el diagnóstico de certeza de progresión a CIN2+. El peor diagnóstico histológico a lo largo de la evolución clínica de la paciente fue el que se consideró en la clasificación de la lesión.

La denominación CIN2+ incluye los diagnósticos de CIN2, CIN3-CIS, CES, AIS y AC. La denominación CIN3+ excluye el diagnóstico de CIN2.

3.3 DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

3.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se realizó utilizando QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en el caso de biopsias y QIAamp® MinElute™ Media Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en el caso de exudados endocervicales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción de ARN de exudado endocervical se realizó mediante RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2 Detección de ADN de VPH

Para la detección de ADN de VPH se utilizaron dos técnicas:

A) PCR anidada convencional utilizando oligonucleótidos consenso (MY09/MY11 como oligonucleótidos externos y GP5+/GP6+ como oligonucleótidos internos) para amplificar la región conservada L1 como ha sido descrito previamente (Tornesello *et al.*, 2006). La reacción de PCR se llevó a cabo con una ADN polimerasa modificada de *Thermus aquaticus* (Taq) *hot start* (FastStart™ Taq DNA Polymerase, dNTPack; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los genotipos fueron identificados por secuenciación directa de los productos de PCR diluidos utilizando los mismos oligonucleótidos, lo que permite identificar cualquier genotipo previamente caracterizado.

La secuenciación, purificación y lectura de secuencias se llevó a cabo tal y como se explica posteriormente en el apartado “Detección de linajes de VPH16 y VPH18”. La asignación de genotipos se realizó mediante el alineamiento de las secuencias con las de la base de datos

GenBank utilizando una herramienta de búsqueda de alineamientos de base local (BLAST, homología >90 %).

Una segunda reacción de PCR que amplifica la región de beta globina humana fue utilizada como control interno de extracción y amplificación.

B) Sistema de genotipado comercial LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) basado en PCR convencional con oligonucleótidos consenso PGMY y genotipado mediante hibridación reversa en línea. Detecta 37 genotipos, incluyendo todos los genotipos clasificados como de alto riesgo y probable o posible alto riesgo por la IARC (Bouvard *et al.*, 2009).

Esta técnica utiliza la detección de beta globina humana en la propia tira de hibridación reversa como control interno de extracción y amplificación.

Ya que esta técnica no posee una sonda individual para la detección del VPH52 sino que utiliza una sonda común que detecta simultáneamente VPH52, VPH33, VPH35 y VPH58, en el primer estudio se realizó una PCR específica adicional en caso de coinfección por los genotipos 33, 35 y/o 58 para detectar adecuadamente la coinfección de estos genotipos con VPH52 (Sotlar *et al.*, 2004).

En el primer estudio se calculó la atribución de los genotipos de VPH detectados en coinfección como fue descrito previamente (Wentzensen *et al.*, 2009).

- La estimación mínima (Em) se calculó como la frecuencia de cada genotipo de VPH en las infecciones individuales.

- La estimación máxima (EM) fue dada por la prevalencia cruda de genotipos del VPH en las infecciones simples y múltiples, donde el número de las infecciones específicas de un genotipo se divide por el número total de las lesiones estudiadas positivas para VPH.

- La atribución proporcional (EM, proporcional) de infecciones múltiples se estimó de la siguiente forma: cada caso se atribuyó proporcionalmente a cada genotipo de VPH detectado según la frecuencia encontrada de cada genotipo en mono infección.

- La atribución jerárquica (EM, jerárquica) de infecciones múltiples se estimó de la siguiente forma: cada caso se atribuyó al genotipo VPH presente en coinfección que fuese encontrado con mayor frecuencia en mono infección.

3.3.3 Detección de ARN de VPH

Se utilizó un método comercial de amplificación de ARN isoterma (NucliSENS EasyQ® HPV v1.1; Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia), basado en la tecnología NASBA y con un formato en tiempo real que detecta ARNm de los cinco tipos de VPH más frecuentemente asociados con el cáncer cervical. Este ensayo utiliza sondas *molecular beacon* en tres reacciones independientes de NASBA múltiple en tiempo real que se realizan en paralelo.

El ensayo incluye la detección de ARNm de la proteína A específica de ribonucleoproteína nuclear pequeña humana (U1A) en una de las reacciones para comprobar la integridad del ARNm de la muestra.

3.3.4 Detección de linajes de VPH16 y VPH18

Para la caracterización de linajes de VPH, un fragmento de 751 pb de la región LCR-E6 del VPH16 y otro de 998 pb de la misma región del VPH18 fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos descritos previamente (Xi *et al.*, 2006) y una mezcla de ADN polimerasas de alta fidelidad: Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Los productos de PCR fueron purificados mediante filtración utilizando microconcentradores Microcon® YM-100 (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) o placas MultiScreen® PCRμ96 (Millipore Corporation, Temecula, CA, EUA). La concentración de ADN fue cuantificada mediante un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, EUA) y ajustada a 20-40 ng/μl. Los amplicones fueron secuenciados automáticamente en

un volumen de reacción de 5 µl utilizando el reactivo BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Austin, TX, EUA) y posteriormente purificados con placas de filtración Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore Corporation, Temecula, CA, EUA). Una secuencia sentido y otra antisentido en el caso de VPH16 y dos secuencias sentido y dos antisentido en el caso de VPH18 fueron obtenidas con el secuenciador ABI PRISM® 3100-*Avant* (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, EUA).

Las secuencias se analizaron con los programas ChromasPro 1.5 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia), BioEdit 7.0.5.3 (Hall TA, 1999) y ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Para el análisis filogenético se utilizaron los programas RAxML HPC v8 (Stamatakis A, 2014) y FigTree 1.4.

Se incluyeron en el análisis diez secuencias de referencia de VPH16 (719 pb) y nueve en el caso del VPH18 (983 pb) (Burk *et al.*, 2013). La prevalencia de las variantes T350G, T350 o de la mezcla de ambas (T350K) también fue descrita para el linaje A del VPH16. Las secuencias representativas de cada grupo de secuencias muy relacionadas (<0.4 diferencias) obtenidas en este estudio fueron depositadas en GenBank (VPH16: KJ543714-28, VPH18: KJ543707-13).

3.3.5 Caracterización de la región L1 de VPH16

Para la caracterización de la región L1 se amplificaron un total de 423 pb mediante PCR anidada convencional utilizando oligonucleótidos descritos previamente (Wheeler *et al.*, 1997) y la mezcla de polimerasas Expand High Fidelity PCR System. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados con los oligonucleótidos internos tal y como se ha descrito en la sección previa (“Detección de linajes de VPH16 y VPH18”).

3.3.6 Detección del SNP T350G en la región E6 de VPH16

Para el ensayo de discriminación alélica se utilizaron dos oligonucleótidos específicos de secuencia (sentido y antisentido) y dos sondas TaqMan® *minor groove binding* (MGB)

específicas de alelo. Cada sonda está marcada con un fluoróforo emisor distinto en el extremo 5' y una molécula no fluorescente que absorbe la emisión del fluoróforo correspondiente (*non fluorescent quencher*) en el extremo 3'. La sonda marcada con VIC detecta la secuencia del alelo 1 (350T) y la sonda marcada con FAM detecta la secuencia del alelo 2 (350G).

Para diseñar los oligonucleótidos y las sondas, secuencias del gen E6 de los diferentes linajes de VPH16 depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) fueron alineadas utilizando el programa ClustalW. La mezcla de oligonucleótidos y sondas fue diseñada mediante una herramienta informática de la propia casa fabricante (Custom TaqMan® Assay, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Warrington, Reino Unido). La mezcla de reacción utilizada fue TaqMan® GTXpress™ Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Warrington, Reino Unido) con una concentración final de oligonucleótidos y sondas de 900 µM y 200 µM, respectivamente. La reacción se llevó a cabo pipeteando 1 µl de extraído de ácidos nucleicos en un volumen de reacción de 5 µl en un termociclador de PCR en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Warrington, Reino Unido) bajo las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min; 45 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. La adquisición de datos de fluorescencia se realizó en cada ciclo durante la fase de anillamiento/extensión utilizando los filtros VIC y FAM. Se realizaron también otras dos adquisiciones de datos de fluorescencia a 25 °C: una antes de comenzar y otra al finalizar la reacción. La duración total fue de aproximadamente 110 min.

3.4 CÁLCULO DEL IMPACTO VACUNAL

Se calculó el impacto potencial de la vacunación en la incidencia acumulada de CIN2, CIN2+ y CIN3+. La reducción relativa esperada se estimó para cada grupo histológico como la suma de

los productos de la multiplicación de la prevalencia de VPH anterior a la introducción de la vacunación, la cobertura vacunal y la eficacia de la vacuna para cada genotipo de VPH.

Para la prevalencia de VPH anterior a la introducción de la vacunación, se utilizaron datos propios de prevalencia tipo específica (EM, jerárquica, excluidos los casos negativos, expresado en porcentaje) en CIN2, CIN2+ y CIN3+. Para la protección directa, se utilizaron los datos de prevalencia de VPH16 y VPH18. Para la protección cruzada, los datos de prevalencia de VPH31, VPH33 y VPH45.

La cobertura regional de la vacuna utilizada en Galicia actualmente estaba disponible en el registro de datos de los puntos de vacunación -tanto públicos como privados- del Registro del Programa Gallego de Vacunación para las mujeres nacidas entre 1994 y 1997 (última revisión: junio de 2012). Los datos de mujeres nacidas en 1995 también fueron confirmados por un estudio de cobertura vacunal realizado durante el año 2011. Fue considerada una cobertura de vacunación de 0.80 basándose en datos de las mujeres que nacieron en 1994. Se calculó la media de cobertura con una, dos y tres dosis para este grupo.

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Para todos los cálculos de medias se calculó el intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %). Las medias fueron comparadas mediante el test de *t*-Student (SPSS 15.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cualitativas fueron comparadas mediante el test chi-cuadrado o Fisher estimando, cuando procedía, el *odds ratio* (OR) y su IC 95 % así como la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo (VPP, VPN) y su IC 95 %. Dichas comparaciones se realizaron mediante los programas Epidat (Santiago Pérez *et al.*, 2010) y Stata 12 (StataCorp LP, TX). En todos los casos, un valor de *p* bilateral <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

4 RESULTADOS



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original article

Cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse in Galicia, Spain: HPV 16 prevalence and vaccination impact



Sonia Pérez-Castro^{a,*}, Yolanda Lorenzo-Mahía^b, Amparo Iñarrea Fernández^c, María José Lamas-González^c, María Teresa Sarán-Díez^c, Joaquín Rubio-Alarcón^a, María Consuelo Reboredo-Reboredo^c, Sonia Mosteiro-Lobato^b, Isabel López-Miragaya^a, Julio Torres-Piñón^a, Santiago Melón-García^d

^a Department of Microbiology, University Hospital of Vigo, Vigo, Pontevedra, Spain

^b Department of Pathology, University Hospital of Vigo, Vigo, Pontevedra, Spain

^c Department of Gynecology, University Hospital of Vigo, Vigo, Pontevedra, Spain

^d Department of Virology, University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 May 2013
Accepted 18 September 2013
Available online 22 November 2013

Keywords:
Uterine cervical dysplasia
Vaccination
HPV 16
HPV 31
Prevalence

Palabras clave:
Displasia uterina cervical
Vacuna
HPV 16
HPV 31
Prevalencia

ABSTRACT

Introduction: The etiology of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse (CIN2+) can influence the efficacy of Public Health preventive strategies. This study aimed to determine the high-risk papillomavirus (HR-HPV) prevalence in CIN2+ cases in unvaccinated women in Galicia (Spain), the expected impact of bivalent vaccination, and the distribution of HPV 16 in squamous lesions.

Material and methods: Ninety-four histologically confirmed cases of CIN2+ (2009–2010) were retrospectively studied: 23 CIN2, 58 CIN3– squamous carcinoma in situ (CIN3-CIS), 5 adenocarcinoma in situ (AIS), and 8 invasive squamous cervical cancer (SCC). Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was performed on the cervical specimens. Bivalent vaccination impact was calculated, based on regional vaccination coverage data, local HR-HPV prevalence, and reported efficacy (direct and cross-protection) of the vaccine.

Results: HR-HPV prevalence was 96.8%. The most frequent genotypes were HPV 16 (48.8–58.2%) and HPV 31 (9.3%–12.1%), considering single infections or single-multiple infections, respectively (hierarchical attribution). In squamous lesions, HPV 16 prevalence in women younger than 45 years of age increased in severe lesions (CIN3-CIS/SCC, OR 4.2), and was higher than in older women (OR 5.5). The vaccine could reduce the cumulative incidence of CIN2+ by 50.6% (direct protection), or by 62.7% (direct and cross-protection).

Conclusion: HPV vaccination could have a great impact in women younger than 45 years of age due to the high prevalence of HPV 16 in their lesions.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o peor en Galicia (España): prevalencia de HPV 16 e impacto vacunal

RESUMEN

Introducción: La etiología de la neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o peor (CIN2+) influirá en la eficacia de las estrategias preventivas de Salud Pública. Se pretende conocer la prevalencia de papilomavirus de alto riesgo (VPH-AR) en CIN2+ en mujeres no vacunadas en Galicia (España), el impacto esperado de la vacunación bivalente y la distribución del VPH 16 en lesiones escamosas.

Material y métodos: Se estudiaron retrospectivamente 94 casos confirmados histológicamente de CIN2+ (2009-2010): 23 CIN2, 58 CIN3– carcinoma escamoso in situ (CIN3-CIS), 5 adenocarcinoma in situ (AIS) y 8 carcinoma escamoso invasivo (CES). Se utilizó Linear Array VPH Genotyping Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en muestras cervicales. El impacto de la vacunación se calculó según la cobertura vacunal autonómica, la prevalencia local de VPH-AR y datos publicados de eficacia (protección directa y cruzada).

* Corresponding author.

E-mail address: sonia.perez.castro@sergas.es (S. Pérez-Castro).

0213-005X/\$ – see front matter © 2013 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.09.011>

Resultados: La prevalencia de VPH-AR fue del 96,8%. Los genotipos más frecuentes fueron HPV 16 (48,8–58,2%) y HPV 31 (9,3–12,1%) considerando infecciones simples o infecciones simples-múltiples, respectivamente (atribución jerárquica). En lesiones escamosas, la prevalencia de VPH 16 en mujeres de hasta 45 años aumentó con la severidad de las lesiones (CIN3-CIS/CES; OR 4,2) y fue mayor que en las mujeres mayores (OR 5,5). La vacuna podría reducir la incidencia acumulada de CIN2+ un 50,6% (protección directa) o un 62,7% (protección directa y cruzada).

Conclusión: La vacunación frente al VPH podría tener un gran impacto en mujeres menores de 45 años debido a la alta prevalencia de VPH 16 en las lesiones que presentan.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Todos los derechos reservados.

Introduction

The knowledge of a 99.7% worldwide HPV prevalence in cervical carcinomas¹ and the fact that persistence of a high risk human papillomavirus (HR-HPV) infection is essential for the development, maintenance and progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN)^{2,3} have changed cervical cancer prevention. Several longitudinal, randomized-controlled trials^{4–6} have demonstrated improved prevention of high-grade CIN and cervical cancer with the introduction of HPV testing in cervical screening. In the particular case of Galicia (Spain), an organized cervical cancer screening protocol was introduced by Galician Public Health Service in 2008 according to European and National recommendations (www.sergas.es). In brief, it was a Pap-based screening program. In case of detection of low-grade or high-grade cytological alterations women were referred to colposcopy. The HPV DNA testing was used as a triage test for colposcopy referral in case of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) in women older than 25 years of age.

Two HPV vaccines, namely Merck' Gardasil® and GSK' Cervarix®, approved by Federal Drug Administration (FDA) in 2006–2007 protect against acquisition of infections with oncogenic HPV types 16 and 18 and their lesions,^{7,8} which are responsible for about 70% of all cervical cancers.⁹ In September of 2008, free vaccination of girls aged 14 years against HPV 16 and 18 with the bivalent vaccine was introduced in Galicia (Spain). The impact of the vaccination on cervical cancer incidence is expected to take several decades to manifest itself.

The implementation of any new intervention requires surveillance in the general population to measure its efficacy. To provide a baseline HPV-type specific prevalence in precancerous and cancerous cervical lesions is essential for future comparisons in order to evaluate the impact of screening protocols and vaccination in cervical cancer prevention.

In this way, a retrospective study was performed in order to know the HPV prevalence in histologically confirmed cases of moderate-grade CIN or worse (CIN2+) which were detected in Galicia, Spain, prior to widespread HPV vaccination, the expected impact of bivalent vaccination in these cervical lesions and the distribution of HPV 16 in squamous lesions.

Methods

Patients, ethical statement and epidemiological data

We conducted a retrospective study including consecutive cases of CIN2+ diagnosed during 2009–2010 in women attending the Gynecological Unit of Meixoeiro Hospital (University Hospital of Vigo, Galicia, Spain) for cervical cancer screening. Women had not been vaccinated with any HPV vaccine at time of diagnosis. Ninety-four women agreed to be enrolled.

This study received approval from the ethics committee of clinical investigation of Galicia (Santiago de Compostela, Spain). All study participants provided written informed consent before inclusion.

Data for age at first worst histological diagnosis, previous cytological screening and following treatment were reported. Nationality, race, oral contraceptive use, smoking, age at first sexual intercourse and lifetime number of sexual partners were collected by voluntary questionnaire filled in by the patients themselves and received by mail. When possible, they were compared with sexual risk behavior data obtained in the year 2009 from Galician general population by 7988 telephone interviews to women (aged 16–49 years) selected from a health database by simple random sampling (Galician risk behaviors information system, SICRI, unpublished data).

Histological diagnoses

Cervical biopsy specimens sampled under a colposcopic guide were considered for diagnosis. Additional biopsies were studied in case of conization or hysterectomy. The worst histological diagnosis was considered for the patient classification. Diagnoses of moderate dysplasia-cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN2), severe dysplasia-cervical intraepithelial neoplasia grade 3-carcinoma in situ (CIN3-CIS), invasive squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma in situ (AIS), and adenocarcinoma (AC) were referred to here as CIN2+. CIN3+ excluded CIN2.

HPV detection and genotyping

A total of 46 deparaffined biopsies and 48 endocervical exudates samples collected at CIN2+ diagnosis time or within the previous 4 months were studied. DNA was isolated from biopsies using QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) and from exudates using a QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Amplification and detection were carried out using the Linear Array HPV Genotyping Test (Linear Array, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Additional specific PCR was performed in case of HPV 33, 35 and/or 58 infection¹⁰ in order to detect properly coinfection of any of these three genotypes with HPV 52.

For this work, HPV genotypes were classified as high-risk (HR-HPV, IARC Group 1 carcinogens: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) and probable/possible-high-risk (pHR-HPV, IARC Groups 2A/B carcinogens: 26, 34, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 – including IS39 subtype) following the classification proposed by the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group.¹¹ According the different grades of dysplasia, HPV genotypes were also classified in two groups: (a) the eight most common HPV genotypes detected in cervical cancer worldwide⁹ divided into 3 subgroups (HPV 16 and 18; HPV 45; HPV 31, 33, 35, 52 and 58) and (b) others.

Attribution of HPV genotypes

Attribution of HPV genotypes was performed as it was described previously.¹² The minimum estimate (ME) was calculated as the frequency of each HPV genotype in single infections. The highest

Table 1
HPV bivalent vaccine coverage. Coverage (%) by year of birth and number of administered doses.

		HPV vaccine coverage (%) by year of birth						
		Registry of the Galician Program of Vaccination				Vaccination coverage study		
		1994	1995	1996	1997	1995	IC95%	
Administered vaccine doses	First	85.1	79.2	91.6	98.4	79.0	75.4	82.6
	Second	81.4	74.0	78.1	74.6	75.5	71.8	79.3
	Third	71.4	63.9	60.5	–	67.1	63.0	71.2

estimate (HE) was given by the crude prevalence of HPV genotypes in single and multiple infections, where the total number of genotype-specific infections observed is divided by the total number of HPV positive studied lesions. In addition, a proportional attribution (HE, proportional) of multiple infections was estimated: a case was attributed proportionally according to the frequency of each HPV genotype as a single infection. The hierarchical attribution (HE, hierarchical) of multiple infections was also estimated: a case was attributed to the HPV genotype present in a multiple infection found with a higher frequency in single infections.

For the comparison of HPV genotype-specific prevalence between the different grades of dysplasia, only the ME and the HE with the hierarchical attribution of multiple infections were used.

For the study of HPV 16 prevalence in squamous lesions by age and severity of lesions, only the HE with the hierarchical attribution of multiple infections was used.

Impact of the vaccination

The potential impact of the vaccination on the cumulative incidence of CIN2, CIN2+ and CIN3+ was calculated. The expected relative reduction was estimated for each histological group as the addition of the products of the multiplication of prevaccine HPV prevalence, vaccine coverage and vaccine efficacy for each HPV type.

For the prevaccine HPV prevalence, data of type-specific prevalence (HE, hierarchical attribution, excluded negative cases, expressed as percentage) in CIN2, CIN2+ and CIN3+ obtained in this study were used. For the direct protection, data of HPV 16 and 18 prevalence were used. For the cross-protection, data of HPV 31, 33 and 45 prevalence were used.

Regional vaccine coverage was available from registration data of vaccination points – both public and private – from the Registry of the Galician Program of Vaccination for women born between 1994 and 1997 (last accession: June of 2012) (Table 1). The data from women born in 1995 were also confirmed by a vaccine coverage study performed during the year 2011. Vaccine coverage of 0.80 was considered based on data from women born in 1994. Mean of coverage with one, two and three doses was calculated for this group of women.

A bivalent vaccine's efficacy of 1 and 0.923 against CIN2+ associated with HPV 16 and HPV 18, respectively, was considered.⁸ A bivalent vaccine's cross-protective efficacy of 0.834, 0.763 and 1 against CIN2+ associated with HPV 31, HPV 33 and HPV 45, respectively, was considered.¹³

Data analysis

For all calculations of means, 95% confidence interval (95% CI) was calculated. Means were compared using *t*-Student test (SPSS version 15.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL).

Qualitative variables were compared with the chi-square test. Odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) were estimated (EPIDAT version 3.1¹⁴).

A two-sided *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 94 women between 18 and 82 years of age at CIN2+ diagnosis time (mean age 37.5 years, 95% CI, 35.1–39.8) were included in this study. Histological diagnoses were: CIN2 (*n*=23), CIN3-CIS (*n*=58), AIS (*n*=5) and SCC (*n*=8). Presence of HR-HPV was detected in 91/94 (96.8%) CIN2+ cases: 43 (47%) single infections and 48 (53%) multiple infections. Type-specific prevalence is shown in Table 2. HPV 16 and 31 were the most frequent genotypes in single and multiple infections. Genotypes other than HPV 16 and 18 were present between 44.2% (ME) and 36.3% (HE, hierarchical).

HPV prevalence for each grade of histological dysplasia is shown in Table 3. The most frequent types (HE, hierarchical) in CIN2 and CIN3-CIS were also HPV 16 and 31. HPV 16, 18 and 45 were the detected genotypes in AIS whereas HPV 16, 18, 31 and 33 were the detected genotypes in SCC.

The cumulative detection of the eight most common HPV genotypes detected in cervical cancer worldwide (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) is shown in Fig. 1. Some cases have been associated with HPV genotypes other than these eight types: 42.8% (ME) to 23.8% (HE, hierarchical) of CIN2 but less than 9.0% of CIN3+ (Fig. 1). The combined detection of HPV 16 and/or 18 ranged from 28.6% (ME) to 47.6% (HE, hierarchical) in CIN2 and from 61.1% to 68.6% respectively in CIN3+ (Fig. 1).

Considering only direct protection of the vaccine, with the introduction of the bivalent vaccine in Galicia, it is expected to reduce the cumulative incidence of CIN2+ by 50.6%, of CIN2 by 37.9%, of CIN3+ by 54.5%.

If cross-protection of bivalent vaccine is also considered, it is expected to reduce the cumulative incidence of CIN2+ by 62.7%, of CIN2 by 50.6% and of CIN3+ by 66.4%.

HPV 16 was predominant and its prevalence ranged between 28.6% (ME) and 42.9% (HE, hierarchical) in CIN2 and between 52.8% and 62.9% in CIN3+. HPV 16 prevalence (HE, hierarchical) by age and diagnosis in squamous lesions is shown in Table 4: this genotype was significantly more prevalent in women aged 45 years or younger. And, between them, its prevalence was significantly higher in CIN3-CIS/SCC than in CIN2. Considering direct protection of the vaccine, it is expected to reduce by 62.6% the cumulative incidence of CIN3-CIS/SCC in women younger than 45 years of age.

Epidemiological data were available from 50 women between 18 and 52 years of age (mean age 36.2 years, 95% CI, 34.1–38.2) who agreed to answer a voluntary questionnaire: CIN2 (*n*=14), CIN3-CIS (*n*=30), AIS (*n*=2) and SCC (*n*=4). The characteristics of these patients and the comparison with SICRI data are shown in Table 5.

Regarding clinical presentation and treatment, women (*n*=86) with CIN2, CIN3-CIS or AIS were younger at the worse histological diagnosis time than those (*n*=8) with SCC: 35.8 years (95% CI, 33.8–37.8) vs 55.0 years (95% CI, 40.1–69.9) (*p*=0.019). Among women with SCC, the two patients infected by HPV 16 and 18 were 49.5 years of age (95% CI, 22.1–76.9). Absence of previous cytological control was observed in 5 cases: 3/59 (5.1%) CIN3-CIS cases

Table 2
Attribution of HPV types to CIN2+ cases.

IARC classification	Genotype	Single type infection				Single-multiple type infection			
		Prevalence		Crude prevalence		Proportional attribution		Hierarchical attribution	
		n	%	n	%	n	%	n	%
HR-HPV	HPV 16	21	48.8	53	58.2	50.4	56.0	53	58.2
	HPV 18	3	7.0	7	7.7	5.0	5.5	5	5.5
	HPV 31	4	9.3	19	20.9	10.4	11.6	11	12.1
	HPV 33	2	4.7	3	3.3	2.1	2.3	2	2.2
	HPV 35	2	4.7	6	6.6	3.5	3.9	3	3.3
	HPV 39	1	2.3	4	4.4	1.3	1.4	1	1.1
	HPV 45	3	7.0	6	6.6	3.6	4.0	3	3.3
	HPV 51	0	0.0	9	9.9	0.0	0.0	0	0.0
	HPV 52	1	2.3	8	8.8	3.0	3.4	2	2.2
	HPV 56 ^a	0	0.0	6	6.6	0.0	0.0	1	1.1
	HPV 58	1	2.3	6	6.6	3.4	3.8	3	3.3
	HPV 59	0	0.0	4	4.4	0.0	0.0	0	0.0
pHR-HPV	HPV 53	1	2.3	5	5.5	1.2	1.3	1	1.1
	HPV 66	0	0.0	4	4.4	0.0	0.0	0	0.0
	HPV 67	0	0.0	1	1.1	0.0	0.0	0	0.0
	HPV 69	1	2.3	1	1.1	1.0	1.1	1	1.1
	HPV 70	0	0.0	1	1.1	0.0	0.0	0	0.0
	HPV 73	1	2.3	5	5.5	2.1	2.4	2	2.2
	HPV 82	2	4.7	5	5.5	3.0	3.3	3	3.3
	Total positives	43	100	153	168.1	90	100	91	100

HR-HPV: high-risk HPV genotypes; pHR-HPV: probable/possible high-risk HPV genotypes.¹¹

^a One HPV 56 and 66 multiple infection was only included in the crude prevalence and in the hierarchical attribution as HPV 56 infection based on the IARC classification of carcinogenic risk. It was considered that the absence of HPV 56 mono-infection was only related with the low number of samples studied.

and 2/8 (25.0%) SCC cases. All women received treatment except one patient who refused and another who moved outside the city. Eighty-seven women were referred to conization, 4 to hysterectomy and 2 to lymphadenectomy. The mean time between first histological diagnosis of CIN2+ and treatment was 13.8 weeks (95% CI, 11.8–15.8). Four CIN2 and 2 CIN3-CIS cases were detected in very young women (less than 25 years of age) and they received treatment.

Regarding the three patients without HR-HPV detection, a low risk genotype (HPV 11) was detected in one case and HPV 31 was detected one year before diagnosis in other case.

Discussion

This study provides data for the local distribution of HPV genotypes among unvaccinated women with CIN2+ in Galicia, Spain.

Table 3
Attribution of HPV types for the different grades of histological diagnoses.

IARC classification	HPV genotype	SCC				AIS				CIN3-CIS				CIN2			
		ME		HE		ME		HE		ME		HE		ME		HE	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HR-HPV	HPV 16	3	50.0	5	62.5			1	20.0	16	59.3	38	66.7	2	28.6	9	42.9
	HPV 18	1	16.7	1	12.5	1	33.3	2	40.0	1	3.7	1	1.8			1	4.8
	HPV 31	1	16.7	1	12.5					1	3.7	6	10.5	2	28.6	4	19.0
	HPV 33	1	16.7	1	12.5					1	3.7	1	1.8				
	HPV 35									2	7.4	3	5.3				
	HPV 39													1	14.3	1	4.8
	HPV 45					2	66.7	2	40.0	1	3.7	1	1.8				
	HPV 51																
	HPV 52									1	3.7	2	3.5				
	HPV 56 ^a											1	1.8				
	HPV 58									1	3.7	1	1.8			2	9.5
	HPV 59																
pHR-HPV	HPV 53									1	3.7	1	1.8				
	HPV 66																
	HPV 67																
	HPV 69												1	14.3	1	4.8	
	HPV 70																
	HPV 73												1	14.3	2	9.5	
	HPV 82									2	7.4	2	3.5			1	4.8
	Total positive	6	100	8	100	3	100	5	100	27	100	57	100	7	100	21	100

ME: minimum estimate, single type infection; HE: highest estimate, single type and multiple type infection (hierarchical attribution). The most frequent type in single type infection is attributed to the case with multiple type infection.

HR-HPV: high-risk HPV genotypes; pHR-HPV: probable/possible high-risk HPV genotypes.¹¹

CIN2: cervical intraepithelial neoplasia grade 2; CIN3-CIS: cervical intraepithelial neoplasia grade 3; SCC: invasive squamous cell carcinoma; AIS: adenocarcinoma in situ.

^a HPV 56 includes one HPV 56 + 66 infection.

Table 4

HPV 16 prevalence excluding AIS. HPV 16 prevalence among HPV positive women by age and histological lesion, excluding AIS.

Age	Histological lesion	HPV 16		OR (95% CI)
		No. cases	%	
<45 years of age (n = 72)	CIN3-CIS, SCC (n = 53)	40	75.5%	5.5 (1.6–19.1) [*]
	CIN2 (n = 19)	8	42.1%	
>45 years of age (n = 15)	ALL	4	26.7	–

^{*} p = 0.008.^{**} p = 0.004.**Table 5**

Epidemiological characteristics. Data from the risk behaviors information system (SICRI) were obtained from women aged 16–49 years in the year 2009. Data of this study were from women aged 18–52 years in the years 2009–2010.

	SICRI 2009 (n = 7988)	Women with CIN2+ (n = 50)
Spanish nationality (%; 95% IC)	88.7 (87.5–89.8)	84.0 (73.5–94.5)
Caucasian race (%; 95% IC)	Not available	92.0 (80.8–97.8)
Daily smokers (%; 95% IC)	31.8 (30.2–33.5)	44.0 (29.7–58.3)
Current oral contraceptive use (%; 95% IC)	Not available	22.0 (9.5–34.5)
Age at first sexual intercourse (mean, 95% IC)	18.4 (18.3–18.5)	18.1 (17.4–18.7)
More than 5 sexual partners along life (%; 95% IC)	11.8 (10.7–13.0)	42.0 (27.8–56.2)

This knowledge could be useful for future evaluations of the impact of the bivalent vaccination that was introduced recently, allow identification of local problems of primary or secondary prophylaxis, of HPV transmission and special needs of Public Health Service interventions.

The data confirmed that HPV 16 is found in the majority of cervical dysplasia, especially in CIN3-CIS and SCC, where more than 60% of the cases were related to this genotype, in agreement with previous data for European patients with invasive disease.^{9,15} HPV 31 was the second most frequent genotype in single or multiple infections, as it was published for CIN2 and CIN3-CIS cases from Spain¹⁵ but higher than it was described previously by others.¹⁶ Differences may be attributable to the relative proportion of CIN2 cases included in the study or to slight differences in the calculation methods. HPV 18 and HPV 45 prevalences were very similar and higher in SCC and AIS. An early detection of invasive cases related to HPV 16 and 18 was found, as it was described previously.^{9,15}

The eight most common HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 and 58) in invasive cervical cancer worldwide have been studied separately: only genotypes belonging to this group have been found in AIS, SCC and around 90% of CIN3-CIS cases. Given the prevalence of HPV 31 in CIN2+ and of HPV 33 and 45 in CIN3+ it seems interesting to study their persistence after infection in order to evaluate the cost-effectiveness of referring women to colposcopy

in case of detection of these genotypes regardless of cytology result as it was suggested previously.¹⁷

Excluding AIS, HPV 16 prevalence (hHE) in women younger than 45 years of age was higher than that in older women. A decline in HPV 16 positivity in women with age and a corresponding increase in positivity for other genotypes has been observed in previous studies.^{18,19} Referring only to this youngest group of women, HPV 16 prevalence (hHE) also increased in severe lesions (CIN3-CIS/SCC).

The local vaccine coverage was satisfactory (80%, 71.4% three doses) for the first vaccinated cohort (women born in 1994). The local expected vaccine impact was a reduction in the cumulative incidence of CIN2+ by 50.6% and of CIN3+ by 54.5% but higher (62.7% and 66.4%, respectively) considering also its cross-protective efficacy. This is consistent with the expected impact of the vaccine that was published recently by other authors in invasive cervical cancer²⁰ and in the HSIL in Spain.²¹ It is important to note that duration of direct and cross-protective efficacy is unknown. Some authors have suggested a potential waning of effect of the cross-protection of bivalent vaccine.^{13,22} The duration of protection against vaccine and non-vaccine type HPVs will have an important effect on the consequences of vaccination.

Data of vaccine efficacy observed in clinical trials have been used in this study for the expected vaccine impact calculations. A

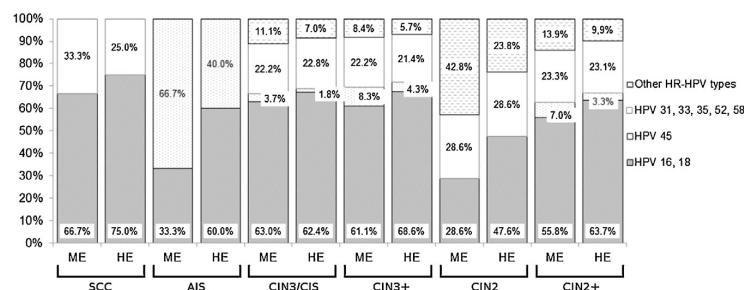


Fig. 1. Cumulative relative contribution of the eight most common HPV types in cervical cancer worldwide by histological category. ME: minimum estimate of type-specific contribution; HE: highest estimate of type-specific contribution (hierarchical attribution); SCC: invasive squamous cell carcinoma; AIS: adenocarcinoma in situ; CIN3-CIS: cervical intraepithelial neoplasia grade 3; CIN3+: SCC, AIS and CIN3-CIS considered together; CIN2: cervical intraepithelial neoplasia grade 2; CIN2+: SCC, AIS, CIN3-CIS and CIN2 considered together.

high vaccine effectiveness against vaccine type infection has been published recently.²³ Several factors as herd protection or vaccine effectiveness of incomplete series of vaccination could modify the vaccine impact.

Although the role of the most frequent carcinogenic types in cervical cancer worldwide has been well established,⁹ the carcinogenicity of less frequent HPV genotypes or their role in multiple infections is still being studied. Referring to crude data, the most frequent non-vaccine (direct or cross-protection) high risk genotypes were HPV 51, 52, 35, 56 and 58. Their crude prevalence (HE) is not expected to be modified by vaccine introduction, but their relative contribution to CIN2+ might be influenced and therefore the impact of the vaccination might be different than estimated.

Based on the current evidence, the recommended screening practices should not change for women with history of HPV vaccination: at least 34% of CIN2+ will continue to happen and data that could support changes in the starting age or the screening interval are missing. At this time, little is known about the real effect of vaccination on the HPV genotype distribution and vaccine effectiveness.²³ The performance of cytology and HPV testing (the two recommended methods for screening²⁴), the duration of protection and the screening adherence after vaccination are still unknown.

It will be necessary to know the fully vaccinated status of the population at an age likely to be prior to HPV exposure. Surveillance systems including CIN3 and Pap registries and monitoring HPV type specific CIN2+ cases will be crucial. The detection of non-vaccine genotypes might be important in HPV type specific screening, particularly in women older than 45 years of age in Galicia.

As the most evident and serious abnormal results determined by cytology, HPV tests, and colposcopy are caused by HPV 16, the positive predictive value for CIN2+ for these three methods will decrease in vaccinated women. In Galicia, the risk of CIN2+ in women younger than 45 years of age may be linked preferentially to HPV 16, so if data demonstrate reductions in cancer risk for vaccinated women, it may be reasonable to delay screening until the age of 25 years. In addition it may be possible to expand the screening intervals if the long-term effectiveness of the vaccine is proven and if HPV testing is added to cervical cytology.

Women included in this study belonged to the general population that was attending a Gynecological Unit for cervical cancer screening. The analysis of their epidemiological data would allow us to detect any bias and to know if the conclusions are representative of the local population. The mean age at first sexual intercourse was lower than it was described previously by other authors.²⁵ This could be attributable to the range of birth year of women that answered the questionnaire in this study (1957–1991) but also to geographical characteristics. It was remarkable that 42.0% of women with CIN2+ included in this study had had more than 5 lifetime sexual partners in contrast with 11.8% in SICRI survey or 5.9% in AFRODITA survey.²⁵ This could be explained by the fact that a relative risk has been found by other authors for SCC and adenocarcinoma, in case of more than 6 lifetime sexual partners.²⁶

The largest number of cases was detected in women aged between 30 and 40 years. This finding was in concordance with age trends of high-grade cervical lesions that were published previously²⁷ where a peak was observed at less than 30 years of age in North America but at relative older age in Europe (25–40 years). This is also related with the age-specific prevalence of HR genotypes described recently in Spain.²⁸ These authors studied general non-vaccinated population and found that HPV prevalence was highest in women aged 18–25 years and decreased with increasing age.

Invasive cases were less common and corresponded to the oldest patients as it would be expectable in a population with a cervical cancer screening program. Four CIN2 and 2 CIN3-CIS cases were detected in very young women (less than 25 years of age), so it

would be interesting to investigate the impact of the introduction of the current program of cervical cancer screening in the overtreatment of very young women as half of them would have regressed in the short term.²⁹

This retrospective study allowed us to know the characteristics of the CIN2+ cases detected just after the implementation of an organized screening protocol of the Public Health Service and to know the baseline local prevalence of HPV genotypes in cervical cancer prior to mass HPV vaccination. Few data have been published of the prevalence of HPV genotypes in CIN2+ in Galicia, Spain. In this study the role of the 8 most frequent HPV genotypes in cervical cancer worldwide in CIN2+ in Galicia, Spain was shown, especially HPV 16, 18, 31, 33 and 45. The highest prevalence of CIN2+ in women aged between 30 and 40 years and the contribution of HPV 16 in CIN2/CIN3-CIS/SCC in women aged 45 years or younger were observed. The calculation of the vaccine impact was based on recent local data of vaccine coverage and HPV prevalence. This knowledge could be useful in Public Health Service evaluations about screening or vaccination policies.

One limitation of the present study is represented by the limited sample size; besides this, half of the patients did not participate with the voluntary questionnaire of epidemiological data. The absence of some HR-HPV mono-infections related with the reduced number of samples was a limitation to attribute properly the multiple infections. For example, in the case of HPV 51, 56, 59, 66, 67 or 70 multiple infections with other HR or pHR-genotype detected in mono-infection in this work, the proportional or hierarchical attribution was added to the other genotype. Although it was considered to be important to include all consecutive cases of CIN2+ along the study period, since it was a retrospective study, in some cases we could not offer the patients the opportunity to be included because they were not alive at inclusion time. Another limitation is that it is difficult to calculate the real impact of the vaccine nowadays until the duration of its protection is well established and the contribution of genotypes in coinfections can be assessed.

Conclusions

Although HPV 16 is the most frequent genotype in CIN2+, other genotypes not included in the vaccine like HPV 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 and 58 are also common, suggesting that the development of new vaccines against a higher number of genotypes is important. HPV vaccination could have a great impact in women younger than 45 years of age because of the high prevalence of HPV 16 in their lesions. Presence of multiple high-risk genotypes in CIN2+ might influence the vaccination impact.

Funding

This work was supported by Consellería de Sanidade, Galicia, Spain.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Malvar A (Department of Epidemiology, Galician Public Health Service, Spain) for critical review of the manuscript. We thank Biomedical Foundation of the University Hospital of Vigo, Spain for the statistical analysis and the English revision of the manuscript. We are also grateful to Taboada P (Peixe Software, SLNE, Spain) for the online software donation for data collection.

References

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12–9.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998;338:423–8.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 1999;354:20–5.
- Bulkmans NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, 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.* 2007;370:1764–72.
- Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1589–97.
- Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:249–57.
- Herrero R, Wacholder S, Rodríguez AC, Solomon D, González P, Kreimer AR, et al. Costa Rica Vaccine Trial Group. Prevention of persistent human papillomavirus infection by an HPV16/18 vaccine: a community-based randomized clinical trial in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer Discov.* 2011;1:408–19.
- Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, et al., HPV PATRICIA Study Group. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet.* 2009;374:301–14.
- de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, 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;11:1048–56.
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3176–84.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al., WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens – Part B: Biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10:321–2.
- Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, Zuna RE, Gold MA, Allen RA, 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.* 2009;125:2151–8.
- Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, Szarewski A, Paavonen J, Naud P, et al., HPV PATRICIA Study Group. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:100–10.
- Santiago MI, Hervada X, Naveira G, Silva LC, Fariñas H, Vázquez E, et al. The Epidat program. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;27:80–2.
- Tjalma WA, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, et al., HERACLES/SCALE Study Group. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer.* 2013;132:854–67.
- Mazarico E, Gonzalez-Bosquet E. Prevalence of infection by different genotypes of human papillomavirus in women with cervical pathology. *Gynecol Oncol.* 2012;125:181–5.
- Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer.* 2012;130:602–10.
- Porras C, Rodríguez AC, Hildesheim A, Herrero R, González P, Wacholder S, et al. Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:863–5.
- Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, et al. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay A study of 432 cases. *J Med Virol.* 2012;84:1628–35.
- Alemany L, Pérez C, Tous S, Llobat-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, et al., Spanish Study Group RIS HPV TT. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol.* 2012;124:512–7.
- Martín P, Kilany L, García D, López-García AM, Martín-Azaña MJ, Abreira V, et al. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect Dis.* 2011;11:316.
- Malagón T, Drolet M, Boily MC, Franco EL, Jit M, Brisson J, et al. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:781–9.
- Markowitz LE, Hariri S, Lin C, Dunne EF, Steinau M, McQuillan G, et al. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003–2010. *J Infect Dis.* 2013;208:385–93.
- Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol.* 2012;137:516–42.
- de Sanjose S, Cortés X, Méndez C, Puig-Tintore L, Torné A, Roura E, et al. Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population: results from the AFRODITA survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;140:234–40.
- Berrington de González A, Green J, International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2007;120:885–91.
- Ting J, Kuzikas DT, Smith JS. A global review of age-specific and overall prevalence of cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20:1244–9.
- Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al., CLEOPATRE Spain Study Group. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol.* 2012;84:947–56.
- Sasieni P, Castanon A, Parkin DM. How many cervical cancers are prevented by treatment of screen-detected disease in young women? *Int J Cancer.* 2009;124:461–4.

Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain

Sonia Pérez^{1*}, Ana Cid², Amparo Iñarrea³, Mónica Pato⁴, María José Lamas³, Bárbara Couso⁴, Margarita Gil³, María Jesús Álvarez⁵, Sonia Rey¹, Isabel López-Miragaya¹, Santiago Melón⁶, María de Oña⁶

1 Department of Microbiology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain, **2** Department of Microbiology, University Hospital of Ourense, Ourense, Spain, **3** Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain, **4** Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Ourense, Ourense, Spain, **5** Department of Pathology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain, **6** Department of Virology, University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

Abstract

Genetic variants of human papillomavirus types 16 and 18 (HPV16/18) could differ in their cancer risk. We studied the prevalence and association with high-grade cervical lesions of different HPV16/18 variant lineages in a case-control study including 217 cases (cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or grade 3 or worse: CIN2 or CIN3+) and 116 controls (no CIN2 or CIN3+ in two-year follow-up). HPV lineages were determined by sequencing the long control region (LCR) and the E6 gene. Phylogenetic analysis of HPV16 confirmed that isolates clustered into previously described lineages: A (260, 87.5%), B (4, 1.3%), C (8, 2.7%), and D (25, 8.4%). Lineage D/lineage A strains were, respectively, detected in 4/82 control patients, 19/126 CIN3+ cases (OR = 3.1, 95%CI: 1.0–12.9, $p = 0.04$), 6/1 glandular high-grade lesions (OR = 123, 95%CI: 9.7–5713.6, $p < 0.0001$), and 4/5 invasive lesions (OR = 16.4, 95%CI: 2.2–113.7, $p = 0.002$). HPV18 clustered in lineages A (32, 88.9%) and B (4, 11.1%). Lineage B/lineage A strains were respectively detected in 1/23 control patients and 2/5 CIN3+ cases (OR = 9.2, 95%CI: 0.4–565.4, $p = 0.12$). In conclusion, lineages A of HPV16/18 were predominant in Spain. Lineage D of HPV16 was associated with increased risk for CIN3+, glandular high-grade lesions, and invasive lesions compared with lineage A. Lineage B of HPV18 may be associated with increased risk for CIN3+ compared with lineage A, but the association was not significant. Large well-designed studies are needed before the application of HPV lineage detection in clinical settings.

Citation: Pérez S, Cid A, Iñarrea A, Pato M, Lamas MJ, et al. (2014) Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain. *PLoS ONE* 9(8): e104678. doi:10.1371/journal.pone.0104678

Editor: Robert D. Burk, Albert Einstein College of Medicine, United States of America

Received: January 20, 2014; **Accepted:** July 16, 2014; **Published:** August 11, 2014

Copyright: © 2014 Pérez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Consellería de Sanidade, Galicia, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: sonia.perez.castro@sergas.es

Introduction

The causal association of high-risk types of human papillomavirus (HR-HPV) with cervical cancer has been well established [1]. The HR-HPV types are highly prevalent in the general population, but the reasons that favor only a small proportion of infections to persist and progress to cancerous lesions are still poorly understood. The association between HPV16 or HPV18 and cervical cancer is precisely related to the DNA composition of their specific genome (odds ratio higher than 300 and higher than 150, respectively) [2].

HPVs contain a circular double-stranded DNA genome of approximately 7.9 kb that consists of eight protein-coding genes divided in an early region (E6, E7, E1, E2, E4, E5) and a late region (L2, L1) and two noncoding regions (the noncoding region [NCR] and the long control region [LCR]). Since complete HPV genomes were available and phylogenetic analysis was applied to the study of HPV, variant lineages would be defined by an approximately 1.0% difference between full genomes of the same HPV type and variant sublineages by a 0.5–1.0% difference between lineages. HPV lineage distribution is related to geographic or race distribution [3]. Nomenclature of these lineages and sublineages has been updated recently [4].

For HPV16, phylogenetic analysis confirmed the description of four lineages [3]: A (previously called European-Asian, EAS), B (African 1, Afr1), C (African 2, Afr2), and D (North-American/Asian-American, NA/AA). Furthermore, nine sublineages have been described: A1, A2, A3 (European, E), A4 (Asian, As), B1 (Afr1a), B2 (Afr1b), D1 (NA), D2 (AA1), and D3 (AA2) [4].

In case of HPV18, three lineages have been described [5]: A (that includes previously called Asian-American and European lineages, AA and E, respectively), B, and C (these two include previous African, Af). Eight sublineages have also been described for this type [4].

Some non-lineage-specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) appear independently of lineage, like 350G polymorphism in the E6 region that has been reported to be frequent in the E sublineages (A1, A2, A3) and in AA (D2, D3) sublineages of HPV16.

Nucleotide changes in HPV16 and HPV18 lineages may interfere with the viral oncogenic potential, and it is unknown whether any modification in the amino acids of the viral capsid may affect the efficacy of vaccination.

Several investigations have suggested the influence of viral genetic variation between HPV16 and HPV18 lineages in viral persistence and the development of cervical cancer [6–15].

Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain

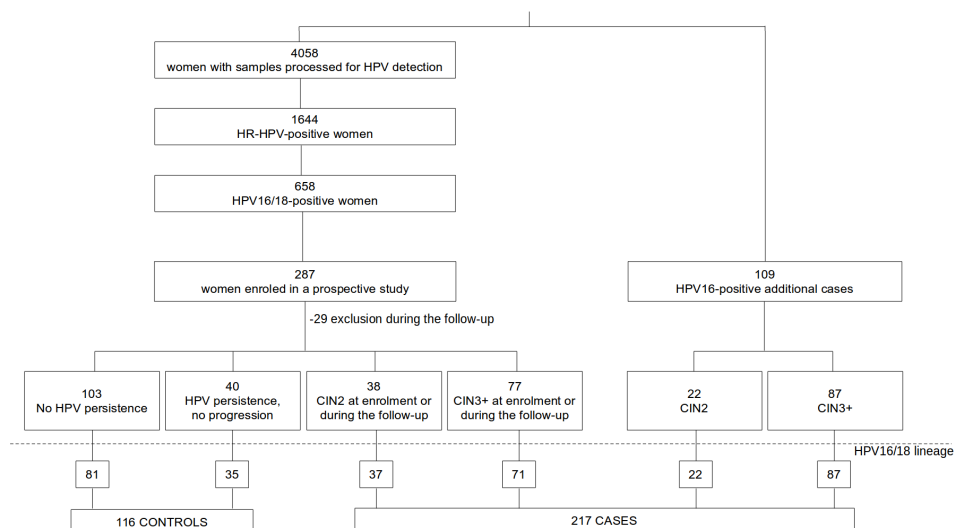


Figure 1. Study population. CIN2: Cervical intraepithelial neoplasia grade 2. CIN3+ includes CIN grade 3-carcinoma *in situ*, invasive squamous cell carcinoma, adenocarcinoma *in situ*, and adenocarcinoma. Controls for the analysis were women without progression to CIN2 or CIN3+ during the two-year follow-up of the prospective study of HPV16/18-positive women. Cases were women with histological diagnosis of HPV16/18-positive CIN2 or CIN3+ at enrolment or during the two-year follow-up of the prospective study. Enrolment of the prospective study: from 2009 to 2010. Additional cases were HPV16-positive CIN2 or CIN3+ cases collected from 2006 to 2008 and 2011 to 2012. doi:10.1371/journal.pone.0104678.g001

The aim of the present study was to know the prevalence and association with high-grade cervical lesions of different HPV16/18 variant lineages in Galicia, Spain.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study received approval from the Ethics Committee of Clinical Investigation of Galicia (Santiago de Compostela, Spain). All study participants were informed about the purpose of the survey and were asked to sign a consent form before taking part in the study. Confidentiality was ensured during data collection and subsequent publication of the results.

Patients and Follow-Up

Women attending the Department of Obstetrics and Gynecology of two university hospitals in Galicia, Spain (Vigo and Ourense), for cervical cancer screening (2006–2012) positive for HPV16 ($n = 333$) or HPV18 ($n = 63$) were included in a case-control study (figure 1).

Between 2009 and 2010, samples from 4058 women were processed for HPV detection in the Microbiology Departments of these hospitals. The presence of HR-HPV was detected in 1644 women. HPV16/18-positive women were offered to be enrolled in a prospective study. Two hundred and eighty-seven out of 658 HPV16/18-positive women were included. Patients were followed for two years with cytology and virological detection every six months to assess viral persistence and progression of the cervical lesions. Colposcopy was performed in case of abnormal cytology, and biopsy was taken in case of abnormal colposcopy. Follow-up was discontinued during pregnancy and continued four months after delivery. Patients with intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN2) or CIN grade 3 diagnosis or worse (CIN3+) at any time during the study received treatment (conization, hysterectomy or

radiotherapy) with the corresponding cytological and virological monitoring after treatment. Main exclusion conditions were conization in the previous 12 months, missing follow-up, or treatment for CIN grade 1.

They were designated as cases (histological diagnosis of CIN2 or CIN3+) or controls (no viral persistence or no progression to CIN2 or CIN3+ in two-year follow-up).

Besides, 109 HPV16-positive cases diagnosed from 2006 to 2008 and 2011 to 2012 in the same department of the University Hospital of Vigo were included.

Epidemiological Data

Data for age at enrolment and age at the first worst histological diagnosis of CIN2 or CIN3+ were collected.

Patients answered a voluntary self-questionnaire composed of questions regarding sociodemographic variables such as race, smoking, and hormonal contraceptives use and questions regarding sexual behavior like age at first sexual contact in order to calculate years since first sexual contact at enrolment.

All women were suggested to be tested to know their HIV serological status. This data was collected when available.

The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Investigation of Galicia (Santiago de Compostela, Spain).

Cytological and Histological Diagnoses

Cytological examinations of Pap smear were reported using the 2001 Bethesda Reporting System [16].

Cervical biopsy specimens were sampled under a colposcopic guide. Additional biopsies were studied in case of conization or hysterectomy. The worst histological diagnosis throughout the clinical course of the patient was considered in the classification of the lesion.

Table 1. Epidemiological characteristics of some patients included in the case-control study.

	HPV 16				HPV 18			
	LINEAGE A		LINEAGE D		LINEAGE A		LINEAGE B	
	CONTROL	CIN3+	CONTROL	CIN3+	CONTROL	CIN3+	CONTROL	CIN3+
Age, y	35.6 (10.6, 82)	35.3 (9.0, 126)	26.5 (4.2, 4)	42.3 (13.5, 19)	31.6 (8.9, 23)	41.0 (10.9, 5)	21.0 (1)	28.1 (1.7, 2)
>30 years	51/82 (62.2)	85/126 (67.5)	1/4 (25)	17/19 (89.5)	11/23 (47.8)	4/5 (80)	0/1 (0)	0/2 (0)
HIV coinfection	0/74 (0)	3/68 (4.4)	0/4 (0)	1/10 (10)	0/19 (0)	0/3 (0)	-	0/2 (0)
Caucasian race	63/68 (92.6)	58/65 (89.2)	3/3 (100)	6/10 (60)	19/22 (86.4)	3/4 (75)	-	1/1 (100)
>5 years since FSI	65/74 (87.8)	66/68 (97.1)	3/4 (75)	11/11 (100)	18/22 (81.8)	4/4 (100)	-	1/1 (100)
>5 years use of HC	47/74 (63.5)	45/66 (68.2)	3/4 (75)	9/10 (90)	13/22 (59.1)	3/4 (75)	-	1/1 (100)
>5 years smoking	47/74 (63.5)	49/68 (72.1)	1/4 (25)	6/11 (54.5)	10/22 (45.4)	2/4 (50)	-	1/1 (100)
Current smoking	30/74 (40.5)	33/68 (48.5)	0/4 (0)	3/11 (27.3)	6/22 (27.3)	0/4 (0)	-	1/1 (100)

Age is given as mean (SD, n) and other as n/N (%).
 FSI: First sexual intercourse.
 HC: Hormonal contraceptives.
 *p<0.05, statistically significant, control group as reference.
 CIN3+ includes cervical intraepithelial neoplasia grade 3 carcinoma in situ, invasive squamous cell carcinoma, adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma.
 doi:10.1371/journal.pone.0104678.t001

Diagnoses of moderate dysplasia-cervical intraepithelial neoplasia grade 3-carcinoma *in situ* (CIN3-CIS), invasive squamous cell carcinoma (SCC), adenocarcinoma *in situ* (AIS), and adenocarcinoma (ADCA) were referred here as CIN3 or worse (CIN3+). Squamous high-grade lesions included CIN3-CIS and SCC. Glandular high-grade lesions included AIS and ADCA. Invasive lesions included SCC and ADCA.

HPV Detection and Genotyping

Two different storage media and two different tests were used for HPV detection and genotyping. Samples were maintained at 2–8°C and processed within 24–72 hours after collection. QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for DNA extraction. The extracted nucleic acids were stored at –20°C. An aliquot of the original sample was also stored at –20°C.

In the case of 138 patients, endocervical samples were collected in ThinPrep PreservCyt Solution (Cytic Corporation, Boxborough, MA, US). After HPV detection with AMPLICOR HPV detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), genotyping was carried out using the Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer’s instructions.

In the case of 100 patients (including 83 additional cases), endocervical samples were collected in TE buffer pH 8.0 Molecular Biology grade (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) and genotyping was carried out using the Linear Array HPV Genotyping Test according to the manufacturer’s instructions.

In the case of 158 patients (including 26 additional cases), endocervical samples were collected in TE buffer pH 8.0 Molecular Biology grade. Nested PCR was used to amplify the L1 conserved region as described previously [17]. Consensus oligonucleotides (MY09/MY11 as outer and GP5+/GP6+ as inner oligonucleotides) and FastStart Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were used for amplification. HPV genotypes were identified by direct sequence analysis of the PCR products using the same oligonucleotides. The protocol is described below (see the (sub)lineages characterization section). Genotypes were assigned by alignments of HPV sequences (homology rate>90%) with those present in the GenBank database using the BLAST software (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

(Sub)lineages Characterization Based on LCR/E6

HPV lineages were characterized in samples at enrolment. For their identification, 751 bp from the LCR-E6 region of HPV16 and 956 bp from the same region of HPV18 were amplified with the primers described previously [15]. The PCR mix contained 25 pmol of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 1x PCR buffer, 2 mM MgCl2, 1IU of Expand High Fidelity Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and 5 µl of extracted sample in a 25 µl reaction volume. We performed PCR amplification with initial denaturalization at 94°C for 5 min followed by 45 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 45 sec, and 72°C for 3 min and the final extension at 72°C for 10 min.

PCR products were purified with YM-100 PCR filter units (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) or PCR cleanup filter plates (Millipore Corporation, Temecula, CA, USA). DNA concentration was quantified on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA) and adjusted to 20–40 ng/µl. Amplicons were automatically sequenced in a 5 µl reaction volume using the Sequencing BigDye

Figure 2. Nucleotide sequence variations of LCR/E6 among HPV16 isolates. Position number refers to the HPV 16 prototype sequence previously described [19].
doi:10.1371/journal.pone.0104678.g002

Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Austin, TX, USA) and then purified with the Montage 96-SEQ (Millipore Corporation, Temecula, CA, USA). All the primers used in amplification and sequencing reactions were listed in Table S1. Forward and reverse DNA sequences (two forward and two reverse in case of HPV18) were obtained with an ABI PRISM 3100 Avant Sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA). The electropherogram files were edited and assembled using Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia) and sequence variation was determined from both directions. SNPs were interpreted visually in comparison to the HPV16 (7906 bp) or HPV18 (7857 bp) prototype sequences previously described [18,19] using a specific software online. The nucleotide sequence data were also examined using the BioEdit (version 7.0.5.3) sequence analysis program [20]. Multiple sequence alignments were carried out using the ClustalW program [21]. For phylogenetic analysis, a maximum likelihood (ML) tree was inferred from the alignments using RAxML HPC v8 [22]. FigTree 1.4 was used to view phylogenetic trees. We included in the analysis 10 LCR/E6 reference sequences (719 bp) in case of HPV16 analysis and nine LCR/E6 reference sequences (983 bp) in case of HPV18 analysis. HPV16 isolates were classified according to the lineages and sublineages described previously [4]. Within the D lineage, some HPV16 isolates could not be classified properly as D2 or D3 because 7743 position was not sequenced. HPV18 isolates were classified according to the lineages and sublineages described previously [4]. HPV sublineage prevalence was described for the different histological diagnoses. Prevalence of E-350G, E-350T variants or a mixture of both (E-350K) was also described for HPV16. Representative sequences from each group of highly related sequences (<0.4 differences) obtained in this study were deposited in GenBank (HPV16: KJ543714-28. HPV18: KJ543707-13).

L1 Region Characterization

L1 region was characterized in samples at enrolment. A total of 423 bp from the L1 region of HPV16 were amplified by nested PCR with primers described previously (table S1) [23] including nucleotide triphosphate, 1x PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1IU of Expand High Fidelity Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and 5 µl of extracted sample in a 25 µl reaction volume. We performed PCR amplification with initial denaturalization at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 50 sec and final extension at 72°C for 10 min for the first amplification, then at 94°C for 10 min, followed by 45 cycles at 94°C for 30 sec, 54°C for 45 sec, and 72°C for 3 min and final extension at 72°C for 10 min for the nested PCR.

PCR products were purified and sequenced with internal primers as described above (see the [Sub] lineages Characterization Based on LCR/E6 section). The prevalence of nucleotide changes in the studied region was described. Representative sequences from each group of highly related sequences (<0.4 differences) obtained in this study were deposited in GenBank (KJ549646-52).

Statistical Analysis

The increased risk for CIN3+, squamous high-grade lesions, glandular high-grade lesions and invasive lesions associated with

certain HPV lineages was calculated using Stata 12 (StataCorp LP, TX). Odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (95% CI) were estimated to assess the strength of association between HPV lineage and cervical lesion risk. Available epidemiological characteristics were described for different groups of HPV lineages. For all calculations of means, standard deviation was calculated. Means were compared using T-Student test. Qualitative variables were compared with the Fisher or the chi-square tests (SPSS version 15, Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL).

Statistical tests performed in the present study were considered significant whenever two-sided *p*-value was <0.05.

Results

Lineage was established in 333 patients. A total of 217 cases and 116 controls were eligible for final analysis. Results of HPV persistence and progression at the end of the two-year follow-up of patients without histological lesion at enrolment are shown in table S2. Due to missing follow-up or treatment for CIN1, 29 women were excluded from the study.

Some epidemiological characteristics that may be related to cervical lesions risk are briefly described in table 1 for CIN3+ cases and control patients.

Characterization of LCR/E6 Region of HPV16

The four lineages of HPV16 were found in the studied population (Fig. 2 and 3). HPV16 clustered in lineage A (260/297, 87.5%), lineage B (4/297, 1.3%), lineage C (8/297, 2.7%), and lineage D (25/297, 8.4%) (table 2). Prevalence of lineage D was 85.7% (6/7) in glandular high-grade lesions. Overall prevalence of the 350G polymorphism in European HPV16 was 134/259 (51.7%) (table S3).

Lineage D and lineage A of HPV16 were respectively detected in 4/82 control patients, 19/126 CIN3+ cases (OR = 3.1, 95%CI: 1.1–12.9, *p* = 0.04, control group as reference), 6/1 glandular high-grade lesions (OR = 123, 95%CI: 9.7–5713.6, *p* < 0.0001), and 4/5 invasive lesions (OR = 16.4, 95%CI: 2.2–113.7, *p* = 0.002) (table 2).

Average age at the histological diagnosis of HPV-16 positive CIN3+ cases was 35.0 ± 9.0 (n = 137) for CIN3-CIS, 46.0 ± 18.0 (n = 7) for SCC, 44.8 ± 12.0 (n = 5) for AIS, and 52.0 ± 7.1 (n = 2) for ADCA. Patients with glandular high-grade lesions (n = 7) were older than those with squamous high-grade lesions (n = 144), (46.9 ± 10.8 vs. 35.5 ± 9.8, *p* = 0.003). HIV coinfection was detected in 6/198 (3%) HPV16- infected women (two patients diagnosed of CIN2 and four diagnosed of CIN3+).

Characterization of LCR/E6 Region of HPV18

Two lineages previously described of HPV18 were found in the studied population (Fig. 4 and 5). HPV18 clustered in lineage A (32/36, 88.9%) and lineage B (4/36, 11.1%) (table 3). Lineage B and lineage A strains were respectively detected in 1/23 control patients and 2/5 CIN3+ cases (OR = 9.2, 95%CI: 0.4–565.4, *p* = 0.12, control group as reference) (table 3).

Characterization of L1 region of HPV16

Sequencing data of the capsid region were obtained for a total of 250 women infected by HPV16 included in the study, and with a valid follow-up. Nucleotide sequence variations of L1 among

Table 2. The distribution of lineages of HPV16 by cervical lesion group.

	HPV16 lineage n				D vs A lineage	
	A	B	C	D	Odds Ratio (95% CI)	P
Control	82	3	3	4	-	-
CIN2	52	-	-	2	-	-
CIN3+	126	1	5	19	3.1 (1.0–12.9)	0.04*
CIN3-CIS	120	1	5	11	-	-
SCC	5	-	-	2	-	-
AIS	1	-	-	4	-	-
ADCA	-	-	-	2	-	-
CIN3-CIS and SCC	-	-	-	-	1.7 (0.5–7.6)	0.43
AIS and ADCA	-	-	-	-	123 (9.7–5713.6)	<0.0001*
SCC and ADCA	-	-	-	-	16.4 (2.2–113.7)	0.002*

CIN2: Cervical intraepithelial neoplasia grade 2. CIN3-CIS: CIN grade 3-carcinoma in situ. SCC: Invasive squamous cell carcinoma. AIS: Adenocarcinoma in situ. ADCA: Adenocarcinoma.

CIN3+ includes CIN3-CIS, SCC, AIS, and ADCA.

*Statistically significant, control group as reference.

doi:10.1371/journal.pone.0104678.t002

HPV16 isolates are shown in figure 6. Genetic variability analysis of L1 region revealed 21 silent nucleotide substitutions and eight nucleotide variations that lead to amino acid changes. The two more frequent non-synonymous SNPs were 6695C (27/250, 10.8%) and 6803T (17/250, 6.8%). The SNP 6803T was exclusively detected in strains previously characterized as lineage D by the LCR/E6 region analysis. The 6803A and 6803T strains were respectively found in 3/88 control patients, 5/1 glandular high-grade lesions (OR = 146.7, 95%CI: 9.9–6996.7, $p < 0.0001$), and 4/4 invasive lesions (OR = 29.3, 95%CI: 3.4–254.6, $p < 0.001$).

No deletions, insertions or recombinations were detected in the analyzed HPV16/18 regions. Mixed populations of HPV strains of the same lineage which differ in certain SNPs were detected in 5/333 (1.5%) patients. Coinfection by two different lineages of the same genotype was not detected in this study.

Discussion

Specific regions of the HPV genome differ in their power to discriminate between all different lineages. In the present study, part of the LCR and E6 region of the HPV16 and HPV18 genome were used for (sub)lineage assignment as these fragments were found to be able to distinguish between all HPV16 and 18 sublineages [3,24]. Four lineages of HPV16 and two lineages of HPV18 were detected in the studied population. The majority of HPV16/18 clustered in the corresponding lineage A, as expected in Spain [6,8].

In patients with glandular high-grade lesions, the lineage D of HPV16 was the most commonly found, as previously reported by other authors [13,25]. Lineage D was also detected in 8% of HPV16-positive squamous high-grade lesions.

Two lineages of HPV18 were found in both cases and control patients. These data differ from those found in another Spanish study [6] where the only lineage present in case of high-grade cytological lesions was the African lineage.

The distribution of HPV16 lineages around the world has been reported to be highly geographically/ethnically specific and their relative risk for cervical cancer has been suggested to be population dependent [8]. There is strong evidence that HPV16 NE sublineages have elevated risk for cancer. Specifically, lineage D has been previously associated with CIN3+ risk [7,12,26,27]. Besides, it was observed recently [12] that there was a possible increased risk for CIN3+ for D2 sublineage (AA2). In the studied population, lineage D was associated with a risk for CIN3+3-fold higher than lineage A. Lineage D was also associated with a higher risk for invasive and glandular high-grade lesions than lineage A. Considering that the association of lineage D with an increased risk for squamous high-grade lesions compared with lineage A was not significant, the results discussed in this paper for HPV16-positive CIN3+ cases might be mainly influenced by the glandular and invasive lesions included in this histological group. The mean age at enrolment of CIN3+ cases was higher than the mean age of control patients in the lineage D group. This could be explained by the association of this lineage with the glandular lesions and the difficult diagnosis of these lesions. Patients with HPV16 infection presenting glandular high-grade lesions were older than those with squamous high-grade lesions (47 years old versus 35 years old).

For HPV16 data analysis, we combined the CIN3+ cases from a prospective study and the CIN3+ supplemental cases drawn from the same population at a different period of time for increased analytic power. Differences in mean age, proportion of CIN3, or glandular high-grade lesions were not significant. Besides, lineage

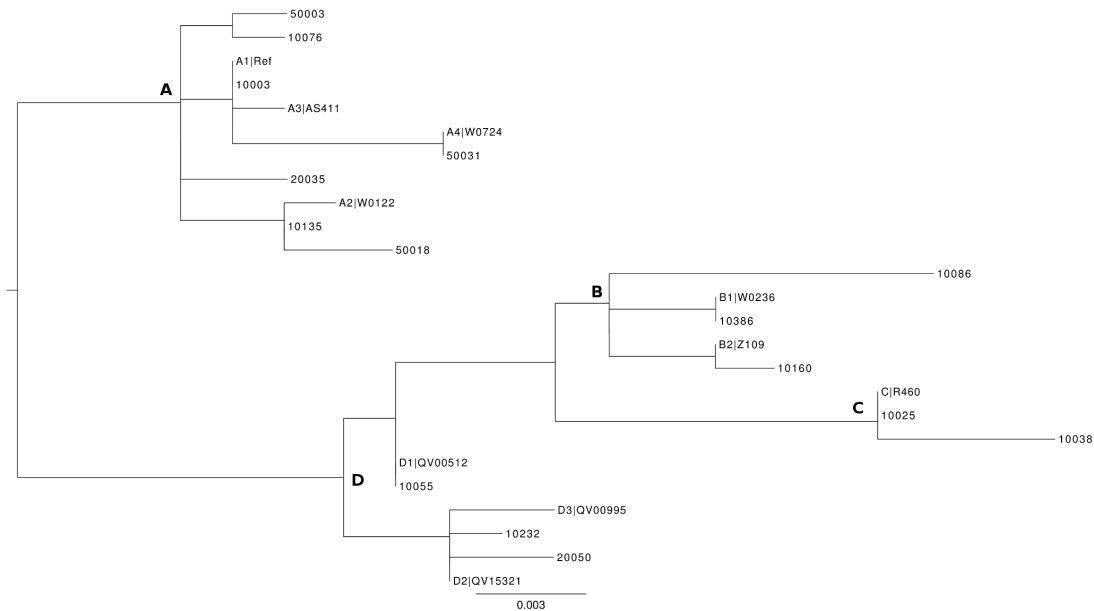


Figure 3. Phylogenetic tree of the HPV16 isolates based on LCR/E6 sequences. Phylogenetic analysis confirmed the presence of the four lineages [4]: A, B, C and D. A maximum likelihood (ML) tree was inferred from an alignment of ten reference sequences and fifteen study sequences of HPV16 LCR-E6 using RAxML HPC v8 [22]. Highly related sequences (<0.4 differences) from the study were not included in this figure. Reference sequences were denominated as lineage|strain. doi:10.1371/journal.pone.0104678.g003

D was similarly distributed between prospective study cases and supplemental cases, justifying combining the two groups.

The common 350G polymorphism is a no lineage-specific SNP localized in the E6 oncogene. It was studied within the European sublineages of HPV16, but no differences were observed in the prevalence of this SNP in relation with the presence of cervical lesions or the age of the patients. Previously reported differences [28] in age might be related with an uneven distribution of invasive lesions between the compared groups.

With regard to HPV18, there is a lack of evidence of the lineages' role in cancer pathogenesis. Although it is the second most common HPV in cervical cancer after HPV16, it is much less prevalent, and the precancerous lesions are infrequently detected,

so progression studies are not easy to perform. Variation at nucleotide 104 was associated to a higher activity of the E6/E7 promoter [29]. AA sublineages (A1, A2) of HPV18 could have increased ability of inducing tumor formation in vivo [30]. Some authors reported a greater risk of lineage A [31]. In this study, lineage B (104T) may be associated with increased risk for CIN3+ compared with lineage A, but the association was not significant, probably due to the small number of included patients. The lineage analysis of the different regions (LCR, E6) was concordant, so the isolates that we have studied did not appear to be the product of genetic recombination between viruses of different lineages. Therefore, in order to simplify the methodology, a single fragment that gives enough information could be used in further

Table 3. The distribution of HPV18 lineages in the case-control study.

	HPV18 lineage n (%)		B vs A lineage	
	A	B	Odds ratio (95%CI)	p
Control	23	1	-	-
CIN2	4	1	-	-
CIN3+ All	5	2	9.2 (0.4–565.4)	0.12
CIN3-CIS and SCC	3	1	-	-
AIS and ADCA	2	1	-	-

CIN2: Cervical intraepithelial neoplasia grade 2. CIN3-CIS: CIN grade 3-carcinoma in situ. SCC: Invasive squamous cell carcinoma. AIS: Adenocarcinoma *in situ*. ADCA: Adenocarcinoma.

CIN3+ includes CIN3-CIS, SCC, AIS, and ADCA.

p, control group as reference.

doi:10.1371/journal.pone.0104678.t003

Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain

strain	1486	1507	1512	1527	1528	1530	1565	1564	1567	1592	1643	1651	1658	1670	1704	1714	1717	1726	1730	1764	1784	1790	38	40	41	45	82	104	251	266	287	317	324	374	377	485	491	548	549	592	lineage	sublineage	Number of patients	Accession Number												
HPV18R	C	A	G	A	A	C	T	G	A	A	T	T	T	A	A	T	T	A	A	T	T	A	C	T	T	A	G	A	T	T	G	C	T	C	G	A	T	C	A	C	C	A	A1	2	KJ543712											
20061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A1	1	KJ543707										
10182	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A1	1	KJ543713										
20109	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	KJ543713									
10029	?	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	-								
10060	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	10	-							
20503	?	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	-							
10057	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	4	-						
10009	-	-	-	-	-	A	G	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	-						
20505	-	-	-	-	-	A	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	-					
20504	-	-	-	-	-	C	-	-	-	A	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3/A4	1	-					
10008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3	1	KJ543708				
10049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A3	5	-			
10174	-	G	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A4	1	KJ543709				
20172	-	-	-	-	-	T	A	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A4	1	-			
10112	-	-	-	-	-	A	A	-	-	C	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A5	1	KJ543710		
10034	G	-	A	-	-	-	-	-	-	C	A	-	-	-	-	C	G	C	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B1	1	KJ543711	
10085	G	-	A	-	-	-	-	-	-	C	A	-	-	-	-	C	G	C	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B1	1	-
10110	G	-	A	-	-	-	-	-	-	C	A	-	-	-	-	C	G	C	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B1	1	-
20501	G	-	A	-	-	-	-	-	-	C	A	-	-	-	-	C	G	C	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B	B1	1	-

Figure 4. Nucleotide sequence variations of LCR/E6 among HPV18 isolates. Position number refers to the HPV18 prototype sequence previously described [18]. doi:10.1371/journal.pone.0104678.g004

lineage studies. Multiple HPV16 variants in one woman were reported to be rare (8.6%) [32], but the prevalence is even lower in this study. The observed difference may be due to differences in the sensitivity and specificity of the methods used to identify variants. Sanger sequence analysis is an insensitive method to detect minority variants, with a sensitivity of approximately 25% for minority populations.

HIV prevalence was 3% in HPV16-infected women. Given the relationship between HIV and HPV in cervical cancer, it might be interesting to take into consideration the HIV coinfection in future studies of cervical cancer risk of HPV lineages.

The study of the L1 region individually provides limited information on viral lineage but it could be helpful if specific

changes in this region were related with severe disease. A part of HPV16 L1 region, commonly used for the detection of HR-HPV in clinical specimens, was sequenced in a limited number of patients previously characterized by LCR/E6 sequencing. In this study, eight amino acid substitutions were identified. The two more common non-synonymous SNPs found in the L1 region were 6695C and 6803T. The 6695C SNP leads to the replacement of Thr at position 353 by Pro. The 6803T polymorphism that results in a substitution of Thr by Ser at position 389 was present in samples that clustered in lineage D in this study. The detection of the 6803T polymorphism was associated to an increased risk for high-grade glandular and invasive lesion compared with the detection of 6803A. It may be

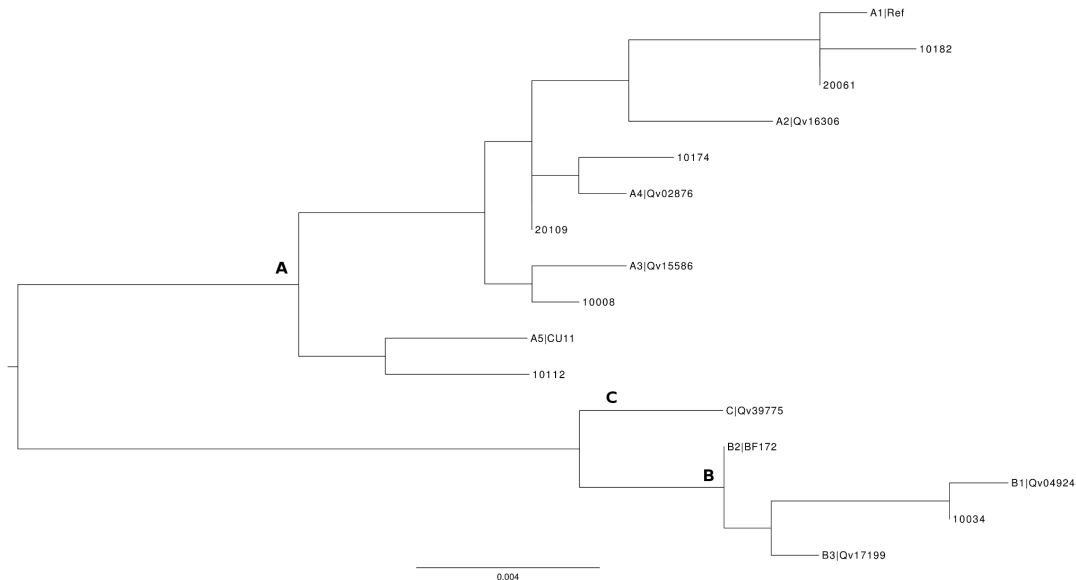


Figure 5. Phylogenetic tree of the HPV18 isolates based on LCR/E6 sequences. Phylogenetic analysis confirmed the presence of two lineages [4]: A and B. A maximum likelihood (ML) tree was inferred from an alignment of nine reference sequences and seven study sequences of HPV18 LCR-E6 using RAxML HPC v8 [22]. Highly related sequences (<0.4 differences) from the study were not included in this figure. Reference sequences were denominated as lineage|strain. doi:10.1371/journal.pone.0104678.g005

strain	6640	6667	6682	6690	6695	6721	6727	6730	6742	6766	6803	6815	6821	6824	6827	6854	6862	6865	6868	6871	6889	6904	6943	6949	6970	6985	6994	6997	Number of patients	Accession Number
HPV16 Ref	T	A	A	C	A	G	C	A	G	T	A	T	A	T	A	C	T	C	A	A	A	A	A	A	C	A	G	A		
10002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	194	KJ549646
20048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
20156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	2	-	
10170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
20002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	1	-	
20019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	1	-	
10193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10065	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	
50023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
20018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
20035	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10245	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10115	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
10084	-	-	-	*T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	
20073	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	
20074	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	KJ549652	
10231	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	KJ549650	
10021	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	T	-	A	2	KJ549647		
10086	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	G	-	-	-	-	T	-	A	1	KJ549649		
10077	-	-	-	-	*C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	7	KJ549648	
10167	-	-	-	-	*C	A	-	-	-	-	-	-	*G	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	T	-	A	1	-		
50017	-	-	-	-	*C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	G	-	-	T	-	A	1	-	
20050	-	-	-	-	*C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C	T	-	-	-	-	-	T	-	A	1	-	
20070	-	-	-	-	*C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	T	-	A	16	KJ549651	
10161	-	-	-	-	*C	A	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	T	-	A	1	-	

Figure 6. Nucleotide sequence variations of L1 among HPV16 isolates. Position number refers to the HPV 16 prototype sequence previously described. Asterisk indicates amino acid substitution. doi:10.1371/journal.pone.0104678.g006

interesting to conduct further studies to investigate the usefulness of this specific SNP detection using quicker and cheaper methods than nucleic acid sequencing analysis. The incorporation of a lineage-specific SNP detection to the current L1-based genotyping methods could help to get a deeper knowledge of the CIN3+ risk of HPV16.

Understanding the genetic basis of the special carcinogenicity of some HPV16 and HPV18 lineages may help us to discover interactions between the virus and the host that could be important to achieve a better control of HPV infection and cervical cancer. Few epidemiological studies of HPV lineages referring to the Spanish population have been published so far [6,28,33–35] and only one of them refers to HPV18. It was observed in a recent multicentre case-control study that the distribution of HPV16 lineages worldwide and their relative risks for cervical cancer could be population-dependent [8], so it seems interesting to provide data from a specific geographical region.

One limitation of the present study is the sample size that restricted the analysis of some histological types of cervical lesions and the analysis of some lineages not commonly found in Europe. Different methods were used for HR-HPV genotyping; this could lead to differences in HPV16/18 detection. Another limitation is the two-year follow-up because some patients included in the control group could have progressed in a longer follow-up. It would be interesting to perform collaborative studies including a larger number of patients to confirm the obtained results.

In summary, lineage A of HPV16 was predominant in Spanish women. Lineage D was associated with increased risk for CIN3+ compared with lineage A. Further large well-designed, age-adjusted studies are needed before the application of HPV16

lineage detection as a high-grade lesion biomarker in clinical settings.

Supporting Information

Table S1 Primers for characterization of HPV16/18 LCR/E6 region and HPV16 L1 region. (DOC)

Table S2 Two-year follow-up of women without cytological lesions at enrolment. The two-year follow-up of women that were attending the Gynecology and Obstetrics Department for cervical cancer screening. Virological and cytological control every six months to assess viral persistence and progression to moderate or high-grade cervical lesions. ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance), LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion), HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion), ASC-H (atypical squamous cells, it is not possible to exclude HSIL). Persistence: Virological persistence. Progression: CIN2+ at enrolment or progression to CIN2+ in follow-up. (DOC)

Table S3 Frequency of SNP 350G of European (E) HPV16. CIN2: Cervical intraepithelial neoplasia grade 2. CIN3-CIS: CIN grade 3-carcinoma in situ. SCC: Invasive squamous cell carcinoma. AIS: Adenocarcinoma *in situ*. ADCA: Adenocarcinoma. CIN3+ includes CIN3-CIS, SCC, AIS, and ADCA. 350K: mix of 350T and 350G. (DOC)

Acknowledgments

We thank González-Alberte S, Martínez-Lemos E, Moure C, Pérez-Paredes M, Rubio J, Rodríguez-Pérez M, Treinta A, and Esteban MG for the exceptional work in the Molecular Biology Department. We also thank Cibes P, Porto M, Saran MT, and Valenzuela O for their contribution in data acquisition and clinical follow-up. We thank Reboredo MC, Buján G, and Troitño L for their careful attention to patients. We thank the Biomedical Foundation of the University Hospital of Vigo, Spain, for the statistical analysis of the manuscript. We are also grateful to Taboada P (Peixe Software, SLNE, Spain) for the development of a specific online

software for SNP comparison and data collection. We also thank Taboada P for his contribution in phylogenetic analysis.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SP AC AI MP MJL BC MG MJA SR ILM SM MO. Performed the experiments: SP AC AI MP MJL BC MG MJA SR ILM SM MO. Analyzed the data: SP AC AI MP MJL BC MG MJA SR ILM SM MO. Contributed reagents/materials/analysis tools: SP AC AI MP MJL BC MG MJA SR ILM SM MO. Wrote the paper: SP AC AI MP MJL BC MG MJA SR ILM SM MO.

References

- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, et al. (2009) A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10: 321–322.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518–527. doi:10.1056/NEJMoa021641.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, et al. (2012) Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86: 6855–6861. doi:10.1128/JVI.00483-12.
- Burk RD, Harari A, Chen Z (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445: 232–243. doi:10.1016/j.virol.2013.07.018.
- Chen Z, DeSalle R, Schiffman M, Herrero R, Burk RD (2009) Evolutionary dynamics of variant genomes of human papillomavirus types 18, 45, and 97. *J Virol* 83: 1443–1455. doi:10.1128/JVI.02068-08.
- Arroyo SL, Basaras M, Arrese E, Hernández S, Andía D, et al. (2012) Human Papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Viol J* 9: 258. doi:10.1186/1743-422X-9-258.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, et al. (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93: 1325–1330.
- Cornet I, Gheit T, Iannaccone MR, Vignat J, Sylva BS, et al. (2013) HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer* 108: 240–244. doi:10.1038/bjc.2012.508.
- Gheit T, Cornet I, Clifford GM, Itner T, Munk C, et al. (2011) Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1315–1321. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1187.
- Schiffman M, Rodríguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, et al. (2010) A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 70: 3159–3169. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4179.
- Sichero L, Ferreira S, Trotter H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, et al. (2007) High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPV16 and 18. *Int J Cancer* 120: 1763–1768. doi:10.1002/ijc.22431.
- Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, et al. (2011) Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS ONE* 6: e21375. doi:10.1371/journal.pone.0021375.
- Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, et al. (2011) Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 121: 32–42. doi:10.1016/j.ygyno.2010.12.005.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, et al. (2000) Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 81: 2959–2968.
- Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, et al. (2006) Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 98: 1045–1052. doi:10.1093/jnci/djj297.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, et al. (2002) The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287: 2114–2119.
- Tornesello ML, Duraturo ML, Botti G, Greggi S, Piccoli R, et al. (2006) Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol* 78: 1663–1672. doi:10.1002/jmv.20752.
- Cole ST, Danos O (1987) Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* 193: 599–608.
- Myers G (n.d.) Human papillomaviruses 1997: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. 3rd edition. Los Alamos (NM): Theoretical Biology and Biophysics.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41: 95–98.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 35: 11–19.
- Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-Martínez N, Anderson DN, Wheeler CM (2005) Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* 338: 22–34. doi:10.1016/j.virol.2005.04.022.
- Quint KD, de Koning MNC, van Doorn L-J, Quint WGV, Pirog EC (2010) HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 117: 297–301. doi:10.1016/j.ygyno.2010.02.003.
- Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, et al. (2003) Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 63: 7215–7220.
- Zuna RE, Moore WE, Shanesmith RP, Dunn ST, Wang SS, et al. (2009) Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int J Cancer* 125: 2609–2613. doi:10.1002/ijc.24706.
- Perez S, Cid A, Araujo A, Lamas MJ, Saran MT, et al. (2011) A novel real-time genotyping assay for detection of the E6-350G HPV 16 variant. *J Virol Methods* 173: 357–363. doi:10.1016/j.jviromet.2011.03.010.
- Rose BR, Thompson CH, Zhang J, Stoeter M, Stephen A, et al. (1997) Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol Oncol* 66: 282–289. doi:10.1006/gyno.1997.4740.
- De la Cruz-Hernández E, García-Carrancá A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, et al. (2005) Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* 86: 2459–2468. doi:10.1099/vir.0.80945-0.
- Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, et al. (2007) Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 4–10. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0670.
- Geraets DT, van Doorn L-J, Kleter B, Colau B, Harper DM, et al. (2013) Long-term follow-up of HPV16-positive women: persistence of the same genetic variant and low prevalence of variant co-infections. *PLoS ONE* 8: e80382. doi:10.1371/journal.pone.0080382.
- Godínez JM, Heideman DAM, Gheit T, Alemany L, Snijders PJF, et al. (2013) Differential presence of papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58. *Infect Genet Evol* 13: 96–104. doi:10.1016/j.meegid.2012.09.011.
- Ortiz M, Torres M, Muñoz L, Fernández-García E, Canals J, et al. (2006) Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J Clin Microbiol* 44: 1428–1434. doi:10.1128/JCM.44.4.1428-1434.2006.
- Pérez-Gallego L, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Suárez A, Gamallo C, et al. (2001) Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *Am J Clin Pathol* 116: 143–148. doi:10.1309/42U5-Q2EV-RCBM-WPGJ.

Table S1: Primers for characterization of HPV16/18 LCR/E6 region and HPV16 L1 region

DNA REGION	GENOTYPE	CHARACTERISTICS	SENSE AND ANTISENSE PRIMERS	USE
LCR/E6	HPV16	Forward	5'-AGGCACATATTTTGGCTTGT-3'	Amplification and sequencing
		Reverse	5'-TTCATGCAATGTAGGTGTATCTCC-3'	Amplification and sequencing
	HPV18	Forward	5'-GTTGCCTTTGGCTTATGTCTG-3'	Amplification and sequencing
		Reverse	5'-TTGCCTTAGTCCATGCATAC-3'	Amplification and sequencing
		Forward, inner primer	5'-AATACTATGGCGCTTTGA-3'	Sequencing
		Reverse, inner primer	5'-TGCTTGCAGTGAAGTTCAG-3'	Sequencing
L1	HPV16	Forward, outer primer	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	Amplification
		Reverse, outer primer	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	Amplification
		Forward, inner primer	5'-AATGGCATTGTTGGGGTA-3'	Amplification and sequencing
		Forward, inner primer	5'-TAATGGCATTGTTGGGGT-3'	Amplification and sequencing
		Reverse, inner primer	5'-CTGATCTAGGTCTGCAGAAAAC-3'	Amplification and sequencing

Table S2: Two-year follow-up of women without cytological lesions at enrolment

	HPV 16 n (%)			HPV 18 n (%)		
	No persistence	Persistence No progression	Progression	No persistence	Persistence No progression	Progression
HSIL/ASC-H	5 (9.8)	-	46 (90.2)	-	-	4 (100)
LSIL	14 (29.8)	7 (14.9)	26 (55.3)	10 (71.4)	2 (14.3)	2 (14.3)
ASC-US	16 (42.1)	7 (18.4)	15 (39.5)	6 (60)	1 (10)	3 (30)
No lesions	38 (52.8)	20 (27.8)	14 (19.4)	14 (63.6)	3 (13.6)	5 (22.7)

The two-year follow-up of women that were attending the Gynecology and Obstetrics Department for cervical cancer screening. Virological and cytological control every six months to assess viral persistence and progression to moderate or high-grade cervical lesions.

ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance), LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion), HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion), ASC-H (atypical squamous cells, it is not possible to exclude HSIL).

Persistence: Virological persistence. Progression: CIN2+ at enrolment or progression to CIN2+ in follow-up

Table S3: Frequency of SNP 350G of European (E) HPV16

	E-350T n (%)	E-350G n (%)	E-350K n (%)
Control	39 (47.6)	42 (51.2)	1 (1.2)
CIN2	27 (52.9)	23 (45.1)	1 (2.0)
CIN3-CIS and SCC	58 (46.4)	66 (52.8)	1 (0.8)
AIS and ADCA	1 (100)	-	-

350K: mix of 350T and 350G



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

A novel real-time genotyping assay for detection of the E6-350G HPV 16 variant

S. Perez^{a,*}, A. Cid^b, A. Araujo^a, M.J. Lamas^c, M.T. Saran^c, M.J. Alvarez^d, I. Lopez-Miragaya^a, S. Gonzalez^a, J. Torres^a, S. Melon^e^a Department of Microbiology, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain^b Department of Microbiology, Complejo Hospitalario de Ourense, Ourense, Spain^c Department of Gynecology, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain^d Department of Pathology, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain^e Department of Virology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

A B S T R A C T

Article history:

Received 23 September 2010

Received in revised form 5 March 2011

Accepted 9 March 2011

Available online 16 March 2011

Keywords:

HPV 16

E6-350G variant

Allelic discrimination

Real time PCR

It has been suggested that some E6 human papillomavirus (HPV) type 16 variants could be involved in viral persistence and progression of HPV infection. A novel one-step allelic discrimination real-time PCR was evaluated for E6-350G variant detection in 102 endocervical HPV 16 positive samples. This assay was also used to assess the distribution of this variant in Spanish women with cervical cancer related to HPV 16.

The detection limit for the allelic discrimination assay was 50 copies per reaction, even where the E6-350G variant represents only 20% of the variants in the sample. Complete concordance was observed between DNA sequencing and the novel AD RT-PCR assay. Fourteen E6-350T reference strains and 18 E6-350G variants were detected out of 32 endocervical samples from women with cervical cancer. The average age of women who were infected by the E6-350G HPV 16 variant was 10 years lower in these samples than in women who were infected by the reference strain.

This novel allelic discrimination assay is a fast, sensitive and specific method for detection of the E6-350G HPV 16 variant.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A variety of Human papillomavirus (HPV) types have been characterized on the basis of differences greater than 10% in the L1 gene sequence (de Villiers et al., 2004). Isolates of the same type are referred to as “variants” when the nucleotide sequences of their coding genes differ by less than 2%, or when the non-coding region (LCR) differs by as much as 5% (Bernard, 2005). For example, HPV 16 variants have been grouped into six distinct phylogenetic branches: E (European), AA (Asian-American), Af1 (African 1), Af2 (African 2), NA (North American), As (Asian) with different geographic distributions. Most HPV 16 variants from European and North American samples were classified as European prototype (EP) (Yamada et al., 1997).

The association between cervical cancer and some HPVs referred to as “high risk” types (Clifford et al., 2003) has long been accepted. Strong and convincing long-term prospective evidence for carcinogenic risk exists for HPV 16 and HPV 18 (IARC, 2007). Several studies have shown that the infection by the European-L83V HPV

16 variant, harboring a nucleotide substitution at position 350 in the E6 gene (E6-350G), is a risk factor for advanced cervical disease although some discrepant results have also been found (Bernard et al., 2006; Grodzki et al., 2006; Xi et al., 2006; Zuna et al., 2009).

Detection of HPV variant has been performed mainly by the traditional Sanger sequencing. In order to achieve a faster and cheaper method it was suggested recently that either pyrosequencing or high resolution melting analysis could also be useful for the identification of these HPV 16 variants (Sabot et al., 2009; Swan et al., 2006).

A new one-step allelic discrimination real time PCR (AD RT-PCR) assay to detect the E6-350G HPV 16 variant was evaluated in clinical samples. This assay was used to assess the distribution of this variant in women with cervical cancer related to HPV 16.

2. Materials and methods

2.1. Endocervical samples

A validation panel was used consisting of HPV 16 positive endocervical samples ($n = 102$) which had been characterized previously by sequencing (Section 2.5). These were obtained from women (average age 35.4 ± 12.5 years old, range 17–76), without

* Corresponding author at: Hospital do Meixoeiro, Apartado Oficial s/n, 36200 Vigo, Spain. Tel.: +34 986 811 711; fax: +34 986 811 711.

E-mail address: sonia.perez.castro@sergas.es (S. Perez).

Table 1
Primers and probes used for the AD RT-PCR assay.

Primers and probes	Sequence (5'-3')	Label (5'-3')	Position	Reference
HPV-16T350G.F	AGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATT	–	225–251	This study
HPV-16T350G.R	CAACGGTTTGTGTTATGCTGTCTCT	–	367–391	This study
HPV-16-350T-probe	TGTTGTTCCATACA <u>AACTATAA</u>	VIC-MGBNFQ	343–364	This study
HPV-16-350G-probe	TGTTCCATACA <u>CACTATAA</u>	FAM-MGBNFQ	343–362	This study

Nucleotide complementary to the predicted single nucleotide polymorphism is underlined.

high grade cervical intraepithelial lesions, who were attending two outpatient gynecology departments in Spain from 2009 to 2010. DNA was isolated using a QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for the initial HPV 16 detection. Amplification and detection were carried out using the Linear Array (LA) HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cross-reactivity of the AD RT-PCR assay was examined by testing those samples included in the validation panel in which we detected co-infection with HPV 16 and other HPV genotypes by LA.

In addition, 32 archival HPV 16 positive endocervical samples from women (average age 41.1 ± 12.5 years old, range 25–72) with cervical cancer were included in the study: 28 squamous cell carcinomas and 4 adenocarcinomas.

The assay was also evaluated with the 2010 WHO HPV Laboratory Network (LabNet) Proficiency Study. The panel was composed of 43 samples of purified whole genomic plasmids of high/low-risk HPV types in a background of human DNA, and three extraction controls. Samples also included single and/or multiple types at varying concentrations which were traceable to established or candidate International Standards to evaluate sensitivity and type-specificity of detection. A test is regarded as proficient for typing HPV 16 if it can detect 50 IU/5 μ l of HPV 16 in samples with single and multiple plasmids. In addition, the specificity of the reported type should be >97%.

All the clinical samples were taken after informed consent of the patients. This study was approved by the Local Ethical Committee (2008/190).

2.2. Positive control samples

In order to determine the detection limit for the AD RT-PCR assay a 761 bp fragment of the LCR-E6 region was amplified as described in Section 2.5, from a sequence extracted from a confirmed HPV 16 E-P strain and E-G131G strain. These papillomavirus gene amplicons were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified them on a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA).

Standard curves were generated employing 10-fold serial dilutions of these gene amplicons in nuclease free water. The linearity and assay sensitivity were determined in Genome Equivalent (copies) per AD RT-PCR reaction in fourplex. Mixtures of these quantified gene amplicons were tested in fourplex in order to evaluate the ability of this assay to amplify from mixed populations of reference and E6-350G variant.

Ten fold serial dilutions of the first WHO International Standard for HPV Type 16 DNA (NIBSC 06/202. National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom) (Wilkinson et al., 2010) were also tested in fourplex. This Standard consists of a calibrated freeze-dried preparation of a recombinant plasmid containing full-length E-P HPV 16 (Accession Number K02718, GenBank).

2.3. DNA extraction

A volume of 0.6–1.0 ml of endocervical exudate collected in liquid medium – Tris EDTA pH 8 or ThinPrep fluid (Cytoc Corp.,

Marlborough, MA, USA), respectively, was centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min and the pellet suspended again in 200 μ l of Tris EDTA pH 8. Nucleic acids were extracted with a QIAamp MinElute Virus Spin in a QIAcube instrument, (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. Protease was used although an RNA carrier was not included.

An additional step was carried out before the AD RT-PCR assay: the total DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA) and adjusted to a maximum of 20 ng/ μ l.

2.4. Allelic discrimination assay

Sequence-specific forward and reverse oligonucleotide primers and two TaqMan MGB (minor groove binding) allele specific probes with a different reporter dye at the 5' end and a non-fluorescent quencher (NFQ) at the 3' end of each probe (Table 1) were used. The probe labeled with VIC® dye detects the Allele 1 (E6-350T) sequence and the probe labeled with FAM™ dye detects the Allele 2 (E6-350G) sequence (Table 1).

To design primers and probes for the one step AD RT-PCR assay, sequences of the different variants of the HPV 16 E6 gene, that were deposited in the NCBI (National Center of Biotechnology Information) (Yamada et al., 1997), were aligned by the clustalW program (Thompson et al., 1994).

Oligonucleotide primers and probes were designed and provided in a $40 \times$ mix (Custom Taqman Assay, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Warrington, UK). The final concentrations of primers and probes were 900 μ M and 200 μ M, respectively.

The reaction was carried out using 1 μ l of extracted sample in a 5 μ l of reaction volume of GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) on an Applied Biosystems 7500 Fast (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 95 °C for 10'; 95 °C for 15' and 60 °C for 1' for 45 cycles. Pre-reading and post-reading were carried out at 25 °C and other data acquisition were obtained during the annealing/extension stage of each cycle in both FAM and VIC filters. The total duration was approximately 110 min. As negative controls, four non-template controls (water) were included in each AD RT-PCR assay run. Two positive controls were tested in each run: 50 copies of a sequence confirmed reference strain and 50 copies of a sequence confirmed E6-350G variant.

2.5. Sequencing

For identification of the HPV 16 variants, 761 bp from the LCR-E6 region (Nt 7701-591) were amplified with primers described previously (Wheeler et al., 1997). The PCR mix contained 25 pmol of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, $1 \times$ PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1U Expand High Fidelity Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and 5 μ l of extracted sample in a 25 μ l reaction volume. We performed PCR amplification with initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 45 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 3 min; final extension at 72 °C for 10 min.

The PCR products were purified with YM-100 PCR Filter Units (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and quantified their concentrations on a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, NC, USA) and adjusted it to 30 ng/ μ l. Sequencing was performed in a 5 μ l reaction volume using the same primers with BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Austin, TX, USA) and then purified with the Montage 96-SEQ (Millipore Corporation, Temecula, CA, USA).

DNA sequences were obtained with an ABI PRISM 3100 Avant Sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA). The chromatogram files were edited and assembled using Chromas Pro 1.5 (Technelysium Pty, Tewantin, Australia). The nucleotide sequence data were examined using the Bioedit (version 7.0.5.3) sequence analysis program (Hall, 1999). Multiple sequence alignments were carried out using the ClustalW program (Thompson et al., 1994). Phylogenetic analyses were conducted as described previously (Yamada et al., 1997) with the MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007). We considered amplification and direct sequencing of the products as the "gold standard" for E6-350G variant detection.

2.6. Data analysis

The SPSS software (version 18.0, www.spss.com) was used for statistical analysis. Age data were analyzed statistically using the Student-*t* test. We considered a *P* value <0.05 to be statistically significant.

3. Results

3.1. Assay sensitivity

The sensitivity of the AD-RT PCR assay for the reference HPV 16 and the E6-350G variant detection was determined to be approximately 50 copies (Crossing Threshold, Ct ~36) (4/4 reactions detected). The assay was linear over the range 5×10^1 – 5×10^7 copies and the slopes were -3.7 and -3.8 (for E6-350T and E6-350G, respectively) with correlation coefficients (R^2 -value) >0.99 for both targets. This demonstrated a broad dynamic detection range for the method and efficient amplification (Figs. 1 and 2).

3.2. Discrimination capacity

The presence of mixtures of the reference strain and E6-350G variant, up to 5% of this variant could be detected in a reaction with a total input of 5.0×10^3 copies. The sensitivity for E6-350G variant detection was conserved (50 copies) when this variant corresponded to 20% of the variants in the sample. The mean Ct values for detection of 5×10^3 , 5×10^2 and 5×10^1 copies of WHO International Standard were, 29.5, 32.1 and 36.4 respectively (4/4 reactions detected) (Figs. 1 and 3).

Fluorescence was detected in the VIC filter only when the reference strain was present. In contrast, fluorescence was detected in the FAM-filter only when the E6-350G variant was present. The non-template negative controls emitted no detectable fluorescence above the background levels in either the FAM or VIC filters.

3.3. Validation panel

The validation panel was assembled using 47 E6-350T (reference) strains (45 E-P, 1 Af-1 and 1 Af-2), 50 E6-350G variants (36 E-P, 4 E-C109G, 4 E-G131G, 1 E-C188G and 5 AA) and 5 E6-350K (G/T) (5 E-P). Complete concordance was observed between DNA sequencing and the novel AD RT-PCR assay for the 102 samples included in the validation panel (Table 2). This panel was duplicated

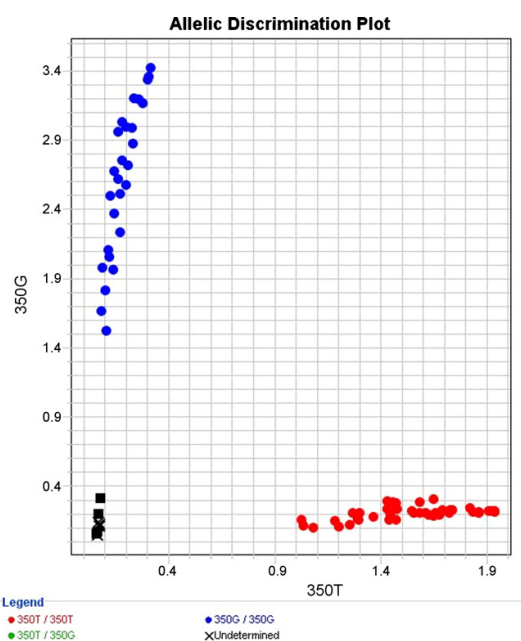


Fig. 1. Allelic discrimination plot. Ten fold serial dilutions of gene amplicons (sequence confirmed HPV 16 reference strain and E-G131G strain: 5×10^6 – 5×10^1 copies) and of WHO International Standard for HPV Type 16 DNA (5×10^3 – 5×10^1 copies).

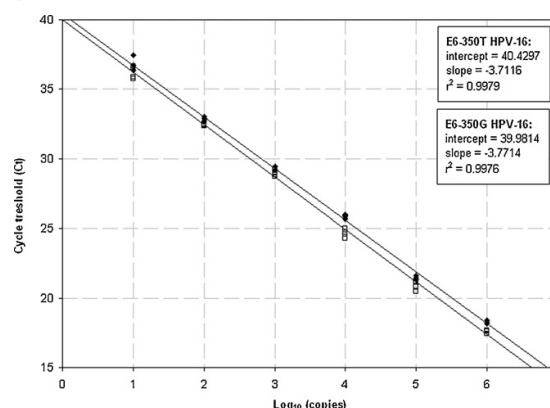


Fig. 2. Determination of the detection limit of the AD RT-PCR assay for E6-350T and E6-350G HPV 16 variants. Quantified standards in the range 10^6 – 10^1 copies were run in fourplex for each target and plotted as Ct (crossing threshold) values versus the log of the copy number of the standard.

Table 2
Results of the validation panel.

HPV-16 variant	Number of samples (%) (N = 102)	Nucleotide 350	
		Sequencing	AD RT-PCR
E-P	45 (44.0)	T	T
	36 (35.3)	G	G
	5 (4.9)	K	K
	4 (3.9)	G	G
	4 (3.9)	G	G
E-C109G	4 (3.9)	G	G
E-G131G	4 (3.9)	G	G
E-C188G	1 (1.0)	G	G
AA	5 (4.9)	G	G
Af2	1 (1.0)	T	T
Af1	1 (1.0)	T	T

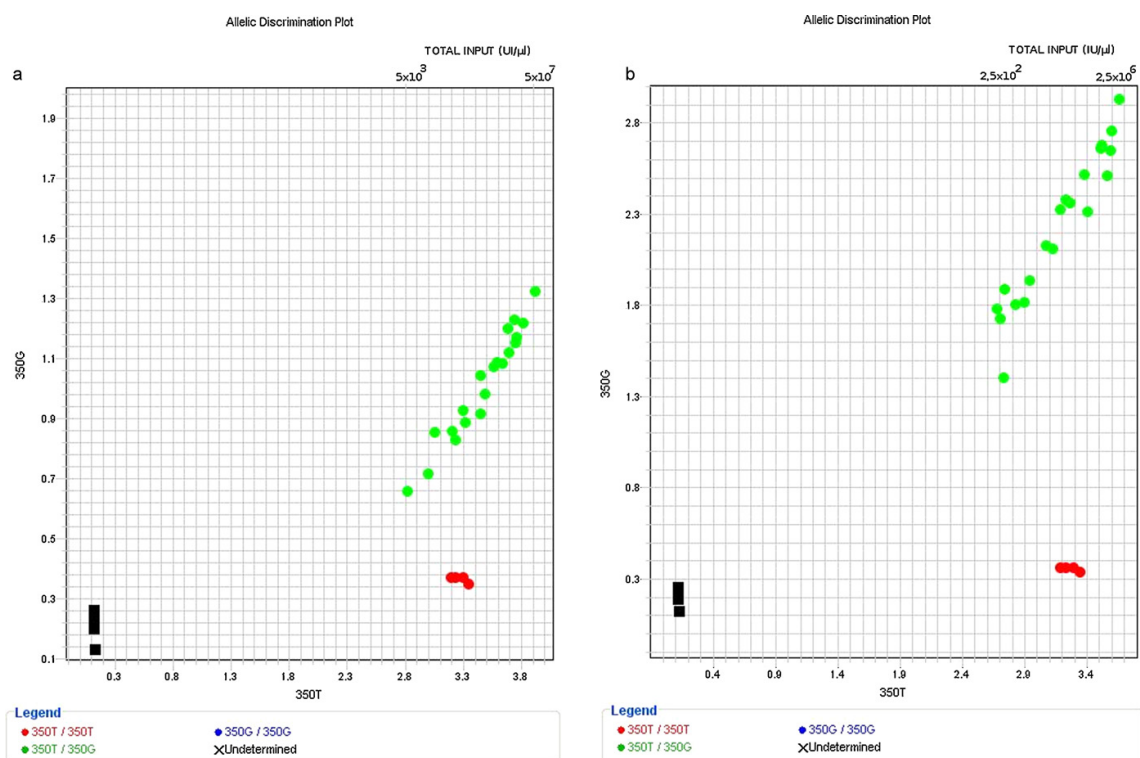


Fig. 3. Discrimination capacity. (a) The figure represents mixes of quantified gene amplicons of E6-350G (5%) and E6-350T (95%) tested in fourplex. We tested mixes of 5% of the E6-350G variant in reactions with a total input of 5.0×10^7 – 5.0×10^3 copies. (b) The figure represents mixes of quantified gene amplicons of E6-350G (20%) and E6-350T (80%) tested in fourplex. We tested mixes of 20% of the E6-350G variant in reactions with a total input of 2.5×10^6 – 2.5×10^2 copies.

and mean Ct values for replicates were in the range 20.4–39.4 for reference strain and 18.6–38.2 for E6-350G variant respectively. In the case of E6-350K detection, the differences between mean Ct values obtained from each reference sample strain and E6-350G were in the range 0.5–1.6. No cross-reactivity was observed between the AD RT-PCR HPV 16 specific primers and probes and other HPV genotypes present in the clinical samples (Table 3).

3.4. HPV DNA proficiency study 2010

The composition of the panel of the 2010 WHO HPV LabNet Proficiency Study is shown in Table 4. Sensitivity and specificity of the assay was 100%. The AD RT-PCR was regarded as proficient in typing HPV 16.

3.5. Results for cervical cancer

On examining the samples taken from the 32 women with cervical cancer it was observed that the E6-350G variant was found in 18 women (56.3%), and the reference HPV 16 was found in 14 (43.8%) (Table 5). The E6-350G variant was found in all the women studied who had adenocarcinoma. The average age of the E6-350G variant-positive cervical cancer patients (36.6 ± 6.3 years old, range 26–48) was 10.4 years less than that of the reference-positive patients (47.0 ± 15.7 years old, range 25–72), ($p = 0.03$).

4. Discussion

HPV 16 is one of the most important HPV genotypes which cause serious cervical disorders, but among these genotypes, cer-

tain variants have been linked to different clinical outcomes. The classification of HPV 16 is based generally on the characterization of the E6 gene. Performing HPV 16 subtyping by LCR-E6 sequencing within a specific geographical area, often leads to many identical long sequences in which only a few specific hot spots are of special interest (Yamada et al., 1997). For instance, E6-350G is the most frequent single nucleotide polymorphism (SNP) found in HPV 16 and has been suggested as a risk factor for advanced cervical disease by a number of investigators (Berumen et al., 2001; Grodzki et al., 2006; Zehbe et al., 1998; Zuna et al., 2009).

The aminoacid 83 of the oncoprotein is surrounded by highly conserved S-L/V-Y-G aminoacids, which are identical in the genital high-risk oncogenic HPV types but different in the low-risk types HPV 6 and 11 (AGYA and AAYA, respectively). It is reasonable to assume that it may be a site affecting the transformation ability of the viral E6 protein in high-risk oncogenic HPV.

For these reasons, and in order to evaluate the relationship between the HPV 16 variants with the oncogenic activity of this HPV, it was interesting to design an assay for genotyping the 350 nucleotide regardless of the phylogenetic branch of the HPV 16. SNP analysis is being used more widely to characterize and differentiate viruses since sequencing is labor intensive and time consuming. In this study a novel AD RT-PCR was developed which is faster and simpler than sequencing the E6-T350G HPV 16 variant. In comparison with single strand conformation polymorphism assay for the specific detection of this variant (Alemi et al., 1999) it is no more complex than a simple PCR so it is faster and does not require polyacrylamide gel electrophoresis. In addition it allows easy detection of mixtures (E6-350K).

Table 3
HPV genotypes detected in the validation panel samples.

Number of HPV genotypes/sample	HPV genotypes	Number of samples	Number of samples (%) (N = 102)
1	16	31	31 (30.4)
2	6, 16	1	26 (25.5)
	16, 18	1	
	16, 31	1	
	16, 39	3	
	16, 42	1	
	16, 51	2	
	16, 52	1	
	16, 54	1	
	16, 55	1	
	16, 58	2	
	16, 61	1	
	16, 62	2	
	16, 66	2	
	16, 68	1	
	16, 70	2	
	16, 71	1	
	16, 83	1	
	16, 84	1	
	16, CP6108	1	
	3	16, 18, 31	
16, 18, 62		1	
16, 31, 33		1	
16, 35, 51		1	
16, 31, 59		1	
16, 39, 52		1	
16, 42, 51		1	
16, 42, 52		1	
16, 45, CP6108		2	
16, 51, 73		1	
16, 53, 83		1	
16, 54, 56		1	
16, 54, 73		2	
16, 56, 58		1	
16, 59, 68		1	
16, 59, CP6108		1	
4	16, 62, 64	1	15 (14.7)
	16, 62, 84	2	
	16, 84, IS39	1	
	6, 16, 33, 51	1	
	6, 16, 53, 54	1	
	16, 18, 31, 52	1	
	16, 18, 61, 66	1	
	16, 31, 56, 66	1	
	16, 35, 61, 62	2	
	16, 39, 70, CP6108	1	
	16, 51, 53, 54	1	
	16, 51, 53, 62	1	
	16, 51, 69, 83	1	
	16, 53, 68, 84	1	
	16, 53, 73, Cp6108	1	
	16, 61, 67, 81	1	
16, 66, 70, CP6108	1		
5	6, 16, 52, 54, 62	1	4 (3.9)
	6, 16, 52, 66, 84	1	
	16, 45, 61, 62, 70	1	
6	16, 56, 58, 61	1	2 (2.0)
	16, 31, 42, 59, 62, CP6108	1	
7	16, 61, 71, 81, 84, Cp6108	1	1 (1.0)
	6, 16, 53, 54, 56, 66, 84	1	
8	11, 16, 26, 51, 59, 70, 82, Cp6108	1	1 (1.0)

This method was developed initially with HPV 16 standards and 102 clinical samples containing known HPV 16 variants. The limit of detection was 50 copies for the reference strain and the E6-350G variant. A complete correlation was observed between the results obtained with this AD RT-PCR and DNA sequencing. Non-specific binds with the probes were not found. This AD RT-PCR was useful for variant discrimination even in cases of coinfection in clinical samples, where the sample characteristics could have compromised the assay. An Asian HPV 16 was not tested as it was not present in the population studied.

In this study, the discrimination assay was carried out on 32 samples of Spanish women with cervical cancer. In this group, T350G was a common mutation, found in more than 50% of the cases. Other investigators have reported the frequency of the E6-350G variant in cervical cancer samples as follows: 29.6% (Pista et al., 2007), 47% (Zuna et al., 2009), 70% (Pande et al., 2008), 88.2% (Zehbe et al., 1998), 93.3% (Berumen et al., 2001). The characteristics of the women included (age, race, sociodemographic features) and the fact that HPV variants are distributed differently among geographical regions could explain these different results. This also

Table 4

Contents of the proficiency panel and results of the new assay.

Number of HPV genotypes in the sample	IU/ μ l of each HPV	HPV genotypes	AD RT-PCR
0 ^a	–	–	Negative
1	1	16	Positive
	5		
	10		
	500		
	1	18	Negative
	10		
	10	6, 11, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,	Negative
	100	59, 66, 68, 68ME	
4	10	6, 16, 18, 51	Positive
	100		
	10	35, 59, 66, 68ME	Negative
	100		
5	10	11, 16, 31, 33, 58	Positive
	100		
	10	39, 45, 52, 56, 68	Negative
	100		

^a Two samples were negative.**Table 5**

Results of samples from patients with cervical cancer (AD RT-PCR).

	E6-350G	E6-350T
	Number/total (%)	Number/total (%)
CCEE	14/28 (50)	14/28 (50)
AIS	4/4 (100)	0/4 (0)
All	18/32 (56.2)	14/32 (43.8)

remarks the importance of performing local studies to assess the distribution of the E6-350G variant.

The average age of women infected by the E6-350G HPV 16 variant was 10 years lower than women infected by the reference strain. Case control and longitudinal studies will be necessary to estimate the contribution of this variant to the progression of cervical lesions.

It could be of interest to consider other viral and host factors (e.g. viral load, coinfection with other high risk HPV genotypes, viral integration, viral variant, HLA) in other studies to assess the clinical importance of the E6-350G variant.

As the implication of the European E6-350G on persistence or disease progression is still unclear, this AD RT-PCR could be of use for large scale studies, specially when performed in populations with low incidence of non-European variants. It could be interesting to make use of another complementary fast method to discriminate between European and non-European E6-350G variants. It could also be a useful tool for obtaining precise data about recurrent and new infections in epidemiological studies of infection and persistence.

In conclusion, the novel AD RT-PCR assay seems to be sensitive and specific in this study. Performing this assay in endocervical samples, allows HPV 16 detection and screening for E6-350G variant in less than four hours, which makes it useful for surveillance and to confirm HPV 16 persistence.

Acknowledgments

This work was supported by Consellería de Sanidade de Galicia, Spain.

Acknowledgment to Fontanillo MM for the statistical analysis.

References

Alemi, M., Andersson, S., Sällström, J., Wilander, E., 1999. Rapid test for identification of a human papillomavirus 16 E6 L83 V variant. *Diagn. Mol. Pathol.* 8, 97–100.

- Bernard, H.U., 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32 (Suppl. (1)), S1–6.
- Bernard, H.U., Calleja-Macias, I.E., Dunn, S.T., 2006. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer* 118, 1071–1076.
- Berumen, J., Ordoñez, R.M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S.C., Estrada, R.A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G., Madrigal-de la Campa, A., 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 5 (93), 1325–1330.
- Clifford, G.M., Smith, J.S., Plummer, M., Muñoz, N., Franceschi, S., 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 88, 63–73.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27.
- Grodzki, M., Besson, G., Clavel, C., Arslan, A., Franceschi, S., Birembaut, P., Tommasino, M., Zehbe, I., 2006. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 820–822.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41, 95–98.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2007. Human papillomaviruses. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 90, 1–636.
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B.K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S., Das, B.C., 2008. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1060–1066.
- Pista, A., Oliveira, A., Barateiro, A., Costa, H., Verdasca, N., Paixão, M.T., 2007. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *J. Med. Virol.* 79, 1889–1897.
- Sabol, I., Cretnik, M., Hadzisejdić, I., Si-Mohamed, A., Matovina, M., Grahovac, B., Levnat, S., Grce, M., 2009. A new approach for the evaluation of the human papillomavirus type 16 variability with high resolution melting analysis. *J. Virol. Methods* 162, 142–147.
- Swan, D.C., Limor, J.R., Duncan, K.L., Rajeevan, M.S., Unger, E.R., 2006. Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing. *J. Virol. Methods* 136, 166–170.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Wheeler, C.M., Yamada, T., Hildesheim, A., Jenison, S.A., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 11–19.
- Wilkinson, D.E., Baylis, S.A., Padley, D., Heath, A.B., Ferguson, M., Pagliusi, S.R., Quint, W.G., Wheeler, C.M., 2010. Establishment of the 1st World Health Organization international standards for human papillomavirus type 16 DNA and type 18 DNA. *Int. J. Cancer* 126, 2969–2983.
- Xi, L.F., Kiviat, N.B., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Ho, J., Koutsky, L.A., 2006. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1045–1052.
- Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Greer, C.E., Munoz, N., Bosch, F.X., Wheeler, C.M., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* 71, 2463–2472.

- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M., 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58, 829–833.
- Zuna, R.E., Moore, W.E., Shanesmith, R.P., Dunn, S.T., Wang, S.S., Schiffman, M., Blakey, G.L., Teel, T., 2009. Association of HPV 16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int. J. Cancer* 125, 2609–2613.

Human Papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA as a Triage Test After Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA

Sonia Perez Castro,^{1*} Amparo Iñarrea Fernández,² María José Lamas González,² María Teresa Sarán Díez,² Ana Cid Lama,³ María Jesús Álvarez Martín,⁴ Mónica Pato Mosquera,⁵ Isabel López-Miragaya,¹ Nuria Estévez,¹ Julio Torres Piñón,¹ and María Oña Navarro⁶

¹Department of Microbiology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain

²Department of Gynecology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain

³Department of Microbiology, University Hospital of Ourense, Ourense, Spain

⁴Department of Pathology, University Hospital of Vigo, Vigo, Spain

⁵Department of Gynecology, University Hospital of Ourense, Ourense, Spain

⁶Department of Virology, University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

High-risk human papillomavirus (HPV) DNA detection provides high sensitivity but low specificity for moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse histological identification. A prospective study evaluated mRNA testing efficacy for predicting this histological diagnosis in case of HPV 16 and/or 18 DNA detection. A total of 165 endocervical samples harboring HPV 16 and/or 18 DNA were tested with NucliSENS-EasyQ[®] HPV E6/E7-mRNA-assay (Biomerieux, Marcy l'Étoile, France). Women with cytological alterations were referred to colposcopy (n = 111). Moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse was diagnosed in 25.8% of women presenting atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesions and in 89.8% of women with high-grade squamous intraepithelial lesions. mRNA sensitivity was 81.3% and 84.1%, respectively. Specificity was 52.2%, and 80.0%, respectively. Negative predictive value (NPV) was 88.9% in undetermined or low-grade squamous lesions. Positive predictive value (PPV) was 97.4% in high-grade squamous lesions. mRNA reduced colposcopies by 44.3% in undetermined or low-grade squamous lesions. Direct treatment of mRNA-positive cases reduced 77.5% of colposcopies in high-grade squamous lesions. Women without cytological alterations were followed for 18 months (n = 35), and moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse was diagnosed in 34.3%; mRNA sensitivity and specificity were 83.3% and 86.9%, respectively. PPV and NPV were 76.9% and 90.9%, respectively for predicting moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse in 18 months.

mRNA reduced the number of visits for follow-up in 62.2%. In conclusion, NucliSENS-EasyQ[®] HPV E6/E7-mRNA-assay (Biomerieux) can serve as a triage test in case of HPV 16 and/or 18 DNA detection. **J. Med. Virol.** 85:1063–1068, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HPV 16 18; mRNA tests; NucliSENS EasyQ; moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse; cervical cancer screening

INTRODUCTION

Numerous randomized controlled clinical trials [Bulkman et al., 2007; Mayrand et al., 2007; Naucler et al., 2007; Kitchener et al., 2009] have established clearly that testing for high-risk human papillomavirus (HPV) DNA is significantly more sensitive than Pap cytology for detection of moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse (i.e., cervical intraepithelial neoplasia grade 2 and 3, squamous cell carcinoma in situ, squamous cell carcinoma, endocervical adenocarcinoma in situ, and endocervical adenocarcinoma). However, as the HPV infection is in the majority of cases a transient event, the high-risk HPV test

Grant sponsor: Conselleria de Sanidade de Galicia, Spain.

*Correspondence to: Sonia Perez Castro, Hospital do Meixoeiro, Apartado Oficial s/n, 36200 Vigo, Spain.

E-mail: sonia.perez.castro@sergas.es

Accepted 16 January 2013

DOI 10.1002/jmv.23544

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

has a low specificity in detecting moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse. If a screening is based exclusively in one HPV DNA test it would cause a excessive number of colposcopies. For this reason, triage is necessary for women with a positive high-risk HPV test.

HPV testing with cytology triage has demonstrated to be a cost-effective strategy. Some options of women triage after a high-risk HPV detection include to refer women to colposcopy in case of detection of HPV 16 and/or 18 (and/or 31, 33, 45) regardless of cytology result [Rijkaart et al., 2012]. In the ATHENA study the positive predictive value (PPV) for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in women with positive HPV DNA test for 16/18 was higher than the PPV for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse in HPV DNA positive 16/18 negative women with atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion suggesting referral for colposcopy/biopsy in HPV DNA 16/18 positive women with normal cytology [Castle et al., 2011; Wright et al., 2011].

The need for specific tests and biomarkers is becoming even more relevant nowadays when primary HPV testing with cytology triage is being implemented in some countries and when vaccinated women reach the screening age. The most promising target for the biomarkers is the E6/E7 viral oncogene expression. It can be monitored through the detection of E6/E7 viral mRNA transcripts or proteins, or indirectly through the detection of host proteins like p16. In fact, it has been published that mRNA could be more efficient than cytology for the triage of HPV DNA-positive women [Halfon et al., 2010; Benevolo et al., 2011]. In triage of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion cytologies the mRNA test is more specific than repeat cytology [Szarewski et al., 2008, 2012; Sørbye et al., 2011a]. The mRNA test is also more specific than repeat cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy [Sørbye et al., 2011b].

The NucliSens-EasyQ[®] HPV E6/E7-mRNA-assay (Biomerieux; referred to as NucliSens-EasyQ-mRNA test) is a type-specific E6/E7 mRNA-based test for oncogenic types 16, 18, 31, 33, and 45, with both HPV detection and genotyping performed in one reaction of nucleic acid sequence based amplification (NASBA). The mRNA test with five genotypes is more specific than other commercial available HPV mRNA tests [Szarewski et al., 2008, 2012; Koliopoulos et al., 2012]. Some studies have suggested that the differences in diagnostic accuracy between this HPV mRNA test and HPV DNA assays could be more attributable to the limited number of detected genotypes and the lower analytical sensitivity than to the specific amplification of viral mRNA [Boulet et al., 2010; Burger et al., 2011; Ovestad et al., 2011], but a positive HPV mRNA test has shown higher specificity and higher PPV for predicting moderate-grade cervical intraepithelial

neoplasia or worse than a positive HPV DNA test for the same five genotypes [Koliopoulos et al., 2012].

A prospective study was conducted to evaluate the NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) test efficacy for predicting moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse in case of HPV 16 and/or 18 DNA detection in women with and without intraepithelial lesions. This study was carried out as part of a study in Galicia-Spain which is assessing the clinical usefulness of testing for several molecular biomarkers in cervical cancer screening in comparison with HPV DNA testing and cytology.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Cervical samples collected in liquid media of 165 women were tested in order to know the NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) test positivity. The inclusion criteria were age higher than 18 years (average age 34.8 ± 10.3 , 18–75), detection of HPV 16 and/or HPV 18 DNA in a cervical sample and a cytology specimen collected within 4 months before the HPV test. The exclusion criterion was treatment for cervical lesions in the previous year. All study participants provided written informed consent before inclusion.

Clinical Follow-Up

According to protocol, women with cervical abnormalities ($n = 111$) were referred to colposcopy within 7 months after DNA detection and were included to investigate the clinical utility of the E6/E7 mRNA test for moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse detection within 7 months. Women with a cytology result which was negative for intraepithelial lesions and malignancy ($n = 35$) were followed with DNA test and cytology every 6 months until moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse was detected or HPV-DNA was undetectable besides two negative cytologies, for a maximum of 18 months, and were included to investigate the clinical utility of the E6/E7 mRNA test for moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse detection within 18 months.

Cytological and Histological Diagnosis

Cytological examinations of Pap smears were reported using the 2001 Bethesda Reporting System [Solomon et al., 2002]. The atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion reports ($n = 11$) were grouped together with the high-grade squamous intraepithelial lesion ($n = 38$), while the atypical glandular cells reports ($n = 2$) were grouped together with the atypical squamous cells of undetermined significance ($n = 48$). Low-grade squamous intraepithelial lesion group ($n = 29$) and negative (negative for intraepithelial lesions and malignancy) cytology group ($n = 37$), were also considered.

Cervical biopsy specimens were sampled under a colposcopic guide. The benign cases and mild dysplasia-cervical intraepithelial neoplasia grade 1 diagnoses were grouped together here. Women who had undergone colposcopy without a biopsy were placed in this group. The clinical performance of the HPV tests was assessed based on a histological diagnosis, with moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse serving as the disease endpoint and "gold standard."

DNA Detection

Detection of HPV-DNA was carried out by nested PCR using the MY09/MY11 as outer and GP5+/GP6+ as inner oligonucleotides to amplify the L1 conserved region as described previously [Tornesello et al., 2006]. HPV genotypes were identified by direct sequence analysis of the PCR products using the same primers with BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Austin, TX). DNA sequences were obtained with an ABI PRISM 3100 Avant Sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA). Genotypes were assigned by alignments of HPV sequences with those present in the GenBank database using the BLASTn software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html>).

DNA isolation, amplification and detection were also carried out on the first samples taken from each patient using the QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and Linear Array HPV Genotyping Test (Linear Array; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. HPV genotypes were classified as described previously [Bouvard et al., 2009].

mRNA Detection

For E6/E7 mRNA detection, RNA was extracted from 400 μ l of sample by using an Rneasy Plus minikit (Qiagen, Hilden, Germany). The detection was performed by the NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) test according to the manufacturer's instructions. Human U1 small ribonucleoprotein (U1A mRNA) was used as an RNA integrity/adequacy internal control. When both mRNA and the U1A amplification were not detected, the test result was considered invalid. Invalid tests were repeated in the same sample or in a new one fulfilling the same inclusion criteria. Only one sample per patient was considered.

Data Analysis

The test positivity and the accuracy measures for detecting moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse (sensitivity, specificity, positive predictive value [PPV], and negative predictive value [NPV]) and their relative 95% confidence intervals (95% CI) were stratified according to cytological grade at different thresholds: atypical squamous cells of

undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion considered together (undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group) and high-grade squamous intraepithelial lesion for the analysis at 7 months; negative cytology for the analysis at 18 months. All statistical analysis were performed using EPIDAT software version 3.1 (www.sergas.es).

Ethical Statement

This study has the approval of the ethical committee of clinical investigation of Galicia (Santiago de Compostela, Spain). All study participants provided written informed consent before inclusion.

RESULTS

mRNA Accuracy

The NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) positivity rate was 37.8% in the negative cytology group, 55.7% in the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group and 77.5% in the high-grade squamous intraepithelial lesion group (Table I). Genotype 16 was predominant among the included women: HPV 16 without HPV 18 infection was present in 72.4% of women outside the high-grade squamous intraepithelial lesion group and in 95.9% inside the high-grade squamous intraepithelial lesion group (Table II). Coinfection with genotype 31, 33, or 45 was detected by Linear Array (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in 15.2% of the women included. No additional coinfections were detected by NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux). mRNA of HPV 31 ($n = 2$), 33 ($n = 1$), and 45 ($n = 1$) was detected, but only in presence of HPV 16 or 18 mRNA.

Cervical biopsy specimens were sampled in 21/35 patients with negative cytology, 41/60 patients with undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesions, and 49/49 with high-grade squamous intraepithelial lesion (biopsy rate, 60.0%, 68.3%, and 100%, respectively). Accuracy indicators for detecting moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse are summarized in Table I. None of the mRNA-negative moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse cases were DNA-positive for other high-risk HPV.

mRNA as a Triage Test

Among women with cytological abnormalities referred to colposcopy, moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia, or worse was diagnosed within the first 7 months in 25.8% of the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group and 89.8% of the high-grade squamous intraepithelial lesion group. Using NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) for triage in the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group would reduce the colposcopy referral by 44.3% (95% CI 32.7–55.9), losing 18.7% of moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or

TABLE I. Accuracy Indicators for HPV mRNA Shown by Cytological Grade

	Tested women		mRNA positivity ^a		Women with complete follow-up ^b		CIN2+		Sensitivity ^c		Specificity ^d		PPV ^e		NPV ^d	
	N	%	N	95% CI	N	Age ^e	N	%	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI	%	95% CI
Negative at 18 m	37	14	37.8	20.9–54.8	35	36.4 ± 12.2 (21–75)	12	34.3	83.3	58.1–100.0	86.9	71.0–100.0	76.9	50.2–100.0	90.9	76.6–100.0
ASC-US/L-SIL at 7 m	79	44	55.7	44.1–67.3	62	32.7 ± 8.2 (18–52)	16	25.8	81.3	59.0–100.0	52.2	36.6–67.7	37.1	19.7–54.6	88.9	75.2–100.0
H-SIL at 7 m	49	38	77.5	64.8–90.3	49	36.9 ± 10.7 (20–71)	44	89.8	84.1	72.2–96.0	80.0	34.9–100.0	97.4	90.9–100.0	36.4	3.4–69.3

Negative, negative for intraepithelial lesions and malignancy; ASC-US, atypical squamous cells of undetermined significance; L-SIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; H-SIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; CIN2+, cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse diagnosis; 95% CI, 95% confidence interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^aTest positivity and its 95% CI are calculated based on the total number of women tested.

^bComplete follow-up: 6-monthly PCR and cytology for 18 months in the negative cytology group and colposcopy in the other cytological groups.

^cSensitivity, PPV, and its 95% CI are calculated based on the number of women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse diagnosis.

^dSpecificity, NPV and its 95% CI are calculated based on the number of women with colposcopy follow-up without cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or worse diagnosis.

^eAge, average ± standard deviation (range).

worse diagnosis in this group. If every mRNA-positive case in the high-grade squamous intraepithelial lesion group were referred directly to treatment, and only mRNA-negative cases were referred to colposcopy, this test would reduce 77.5% (95% CI = 64.8–90.3) of colposcopies in this group.

At 18 months, moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse was diagnosed in 38.7% of patients with negative cytology. Using NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) for triage, cytological and DNA controls (and therefore the number of visits) could be reduced in 62.2% (95% CI 45.2–79.1) of women with negative cytology, losing 16.7% of moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse diagnosis.

DISCUSSION

The interest of including women with HPV 16 and/or HPV 18 DNA detection in this work was double. Firstly, some triage options after a high-risk HPV detection include colposcopy in case of detection of any of these genotypes regardless of the cytology result. Thus, it seems useful to look for another triage test before the colposcopy. And, secondly, considering only cases of infection by genotypes detected by the mRNA-NucliSens-EasyQ (Biomerieux) test, will avoid the influence of the lesser number of genotypes included in this mRNA test in comparison to the DNA tests.

mRNA Accuracy

This study showed that the mRNA positivity rate increased in more severe cytological grades, as was published previously [Sotlar et al., 2004; Arbyn et al., 2009; Tropé et al., 2009; Sjöborg et al., 2010; Benevolo et al., 2011]. The lack of RNA transcripts, more frequent in case of negative or undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion, reflects possibly an episomal state of the virus, and an effective transcriptional regulation, so there is a higher probability that the infection will clear up spontaneously than in high-grade squamous intraepithelial lesion.

Among patients referred to colposcopy, although sensitivity for moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse diagnosis was conserved, NPV and PPV were related to moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse prevalence, so it was considered it adequate to present the predictive values stratified by cytological grade. As expected, the NPV was highest in the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group and the PPV was highest in the high-grade squamous intraepithelial lesion group.

The 35% of women with a positive NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) test but with no confirmatory high-grade lesion in the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group may be explained in part by the fact that colposcopic biopsy misses one third of prevalent moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse [Jeronimo and Schiffman, 2006; Zuchna et al., 2010; Stoler et al.,

TABLE II. HPV Genotypes Detected at Inclusion in DNA-Positive Samples, Shown by Cytological Grade

	HPV 16			HPV 18			HPV 16 and 18		
	Total	31/33/45 coinfection	Other HR-HPV coinfection	Total	31/33/45 coinfection	Other HR-HPV coinfection	Total	31/33/45 coinfection	Other HR-HPV coinfection
Negative	26	2	6	11	2	6	0	0	0
ASC-US	35	4	15	10	0	5	5	0	2
L-SIL	23	5	12	4	1	1	2	1	1
H-SIL	47	10	13	2	0	0	0	0	0

Negative, negative for intraepithelial lesions and malignancy; ASC-US, atypical squamous cells of undetermined significance; L-SIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; H-SIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; HR-HPV, high risk, probably high risk and/or possible high risk HPV genotypes.

2011]. Therefore, HPV mRNA positive cases with no confirmatory high grade histological diagnosis may actually represent false negatives due to a small lesion or a biopsy not representing the true lesion. When the data analysis was performed with a follow-up of 18 months in the negative cytology group, specificity and PPV of NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) were much better than when moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse was diagnosed in the undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion group with one biopsy within 7 months with similar sensitivity and NPV and only 8.5% more moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse prevalence.

Some authors published that the differences in diagnostic accuracy between the NASBA-based tests and conventional HPV DNA detection assays do not seem attributable to the more specific amplification of viral mRNA, but to the limited type range [Burger et al., 2011; Ovestad et al., 2011] and the lower analytical sensitivity [Boulet et al., 2010]; the last author has even identified viral double-stranded DNA as a possible target for NASBA-based HPV detection. The study tried to minimize these possible inconvenients with a specific RNA-extraction procedure, and by including only women infected by genotypes included in the RNA test. It is very unlikely that the moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse mRNA-negative cases detected in this study are due to HPV infections by other genotypes not included in the test, because DNA of HPV 16 and/or 18 was detected at inclusion time in every patient. Perhaps these negative results may have been due to a very low level of transcription process, not detected by the test.

mRNA as a Triage Test

Only reliable and reproducible HPV tests with high sensitivity and specificity should be implemented in a screening population. Based on the high NPV, in HPV DNA-positive women with undetermined or low-grade squamous intraepithelial lesion, NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) test as a triage test could reduce colposcopy referral drastically, losing sensitivity. This result is concordant with other reports published

previously [Cattani et al., 2009; Halfon et al., 2010; Benevolo et al., 2011]. In HPV DNA-positive women with high-grade squamous intraepithelial lesion, the PPV was so high that a positive result of NucliSens-EasyQ-mRNA (Biomerieux) could avoid the biopsy confirmation of high-grade alterations previous to conization in the studied population, as other authors have proposed [Sørbye et al., 2010; Koliopoulos et al., 2012].

Currently there are no published studies using mRNA-NucliSens-EasyQ (Biomerieux) as a primary test in cervical cancer screening, but it could be very useful as a triage in case of HPV 16 and/or 18 DNA detection and negative cytology because of its high sensitivity and specificity for moderate-grade cervical intraepithelial neoplasia or worse detection. These data suggest that the interval between referral and follow-up cytology could be extended safely to 18 months in case of negative cytology and DNA but no mRNA detection of HPV 16 and/or HPV 18. At the moment, short-term recalls of HPV-positive, cytology-negative women are necessary that require high levels of compliance to follow-up, difficult to achieve. Including mRNA detection to triage may reduce the number of repeated visits.

Limitations

One limitation of the present study is represented by the limited sample size. Another limitation is that detection of HPV or cytological alterations previously to inclusion time were not taken into consideration. In all cases, HPV 16 or 18 infections were detected by PCR followed by direct sequence analysis, so theoretically, in all cases of mixed infections included, these genotypes were predominant over others with lower viral load. It is unknown if the results will be different in presence of other predominant genotypes.

CONCLUSION

In conclusion, NucliSENS-EasyQ[®] HPV E6/E7-mRNA-assay (Biomerieux) can be useful as a triage test in case of HPV 16 and/or 18 DNA detection, although larger studies in DNA positive patients for the genotypes included in the test would be recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Varela, M.C. Reboredo, G. Bujan, and L. Troitiño, who made the follow-up of the patients possible, and the Biomedical Foundation of the University Hospital of Vigo, Spain for the statistical analysis and the English revision of the manuscript, also like to thank Taboada P (Peixe Software SLNE, Spain) for free developing of online software for data collection.

REFERENCES

- Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. 2009. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: A meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med* 13:648–659.
- Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, French D, Rosini S, Zappacosta R, Terrenato I, Cicciocioppo L, Frega A, Giorgi Rossi P. 2011. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J Clin Microbiol* 49:2643–2650.
- Boulet GA, Micalessi IM, Horvath CA, Benoy IH, Depuydt CE, Bogers JJ. 2010. Nucleic acid sequence-based amplification assay for human papillomavirus mRNA detection and typing: Evidence for DNA amplification. *J Clin Microbiol* 48:2524–2529.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V, WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. 2009. A review of human carcinogens—Part B: Biological agents. *Lancet Oncol* 10:3021–3022.
- Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegoijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. 2007. 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* 370:1764–1772.
- Burger EA, Kornør H, Klemp M, Lauvrak V, Kristiansen IS. 2011. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: A systematic review. *Gynecol Oncol* 120:430–438.
- Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Wright TL, Behrens CM. 2011. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: A subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 12:880–890.
- Cattani P, Siddu A, D'Onghia S, Marchetti S, Santangelo R, Vellone VG, Zannoni GF, Fadda G. 2009. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 47:2136–2141.
- Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Péñaranda G, Martineau A, Blanc B. 2010. Stepwise algorithm combining HPV high-risk DNA-based assays and RNA-based assay for high grade CIN in women with abnormal smears referred to colposcopy. *Cancer Biomark* 7:133–139.
- Jeronimo J, Schiffman M. 2006. Colposcopy at a crossroads. *Am J Obstet Gynecol* 195:349–353.
- Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, Gilham C, Baysson H, Roberts C, Dowie R, Desai M, Mather J, Bailey A, Turner A, Moss S, Peto J. 2009. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): A randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 10:672–682.
- Koliopoulos G, Chrelias C, Pappas A, Makridima S, Kountouris E, Alepaki M, Spathis A, Stathopoulou V, Panayiotides I, Panagopoulos P, Karakitsos P, Kassanos D. 2012. The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet Gynecol Scand* 91:794–801.
- Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL, Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group. 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 357:1579–1588.
- Naucner P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, Rådberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. 2007. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 357:1589–1597.
- Ovestad IT, Vennestrøm U, Andersen L, Gudlaugsson E, Munk AC, Malpica A, Feng W, Voorhorst F, Janssen EA, Baak JP. 2011. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN 2–3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CI N2–3. *Gynecol Oncol* 123:278–283.
- Rijkaart DC, Berkhof J, van Kemenade FJ, Coupe VM, Hesselink AT, Rozendaal L, Heideman DA, Verheijen RH, Bulk S, Verweij WM, Snijders PJ, Meijer CJ. 2012. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer* 130:602–610.
- Sjoeberg KD, Tropé A, Lie AK, Jonassen CM, Steinbakk M, Hansen M, Jacobsen MB, Cuschieri K, Eskild A. 2010. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 118:29–34.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright TJR, Young N, Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. 2002. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287:2114–2119.
- Sørbye SW, Fismen S, Gutteberg T, Mortensen ES. 2010. Triage of women with minor cervical lesions: Data suggesting a “test and treat” approach for HPV E6/E7 mRNA testing. *PLoS ONE* 5:e12724.
- Sørbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. 2011a. Triage of women with low-grade cervical lesions—HPV mRNA testing versus repeat cytology. *PLoS ONE* 6:e24083.
- Sørbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. 2011b. HPV E6/E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy. *PLoS ONE* 6:e26022.
- Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 74:107–116.
- Stoler MH, Vichnin MD, Ferenczy A, Ferris DG, Perez G, Paavonen J, Joura EA, Djursing H, Sigurdsson K, Jefferson L, Alvarez F, Sings HL, Lu S, James MK, Saah A, Haupt RM, FUTURE I, II and III Investigators. 2011. The accuracy of colposcopic biopsy: Analyses from the placebo arm of the Gardasil clinical trials. *Int J Cancer* 128:1354–1362.
- Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, Liddle S, Dina R, McCarthy J, Buckley H, Bergeron C, Soutter P, Lyons D, Cuzick J. 2008. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3033–3042.
- Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Young M, Stoler M, McCarthy J, Wright C, Bergeron C, Soutter WP, Lyons D, Cuzick J. 2012. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: The Predictors 2 study. *J Clin Microbiol* 50:1867–1873.
- Tornesello ML, Duraturo ML, Botti G, Greggi S, Piccoli R, De Palo G, Montella M, Buonaguro L, Buonaguro FM, Italian HPV Working Group. 2006. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J Med Virol* 78:1663–1672.
- Tropé A, Sjøberg K, Eskild A, Cuschieri K, Eriksen T, Thoresen S, Steinbakk M, Laurak V, Jonassen CM, Westerhagen U, Jacobsen MB, Lie AK. 2009. Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J Clin Microbiol* 47:2458–2464.
- Wright TC, Jr., Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, ATHENA (Addressing THE Need for Advanced HPV Diagnostics) Study Group. 2011. Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol* 136:578–586.
- Zuchna C, Hager M, Tringler B, Georgouloupolous A, Ciresa-Koenig A, Volgger B, Widschwendter A, Staudach A. 2010. Diagnostic accuracy of guided cervical biopsies: A prospective multicenter study comparing the histopathology of simultaneous biopsy and cone specimen. *Am J Obstet Gynecol* 203:e1–e6.

5 DISCUSIÓN

Desde que se conoce que el VPH es el responsable del cáncer de cérvix, muchos han sido los esfuerzos encaminados a conocer mejor la infección en cuanto a su diagnóstico y evolución. El carácter infeccioso de dicho evento ha permitido diseñar estrategias para evitar el contagio y su desenlace fatal. En este sentido, incluso se han desarrollado vacunas que han mostrado ser eficaces, al menos en los primeros años de su desarrollo.

Los métodos diagnósticos también se han beneficiado de importantes avances, pasando de observar los cambios histológicos a comprender la evolución patológica de dichos cambios y asociarlos con cambios genómicos. Sin embargo, estos esfuerzos todavía no han dado los resultados requeridos y son necesarios estudios que aseguren fielmente cómo son los procesos que se desencadenan y por qué se asocian a unas mujeres y no a otras. En esta vía, no solo se ha puesto especial interés en el huésped, sino también en el virus y sus condiciones genéticas.

Aún queda por determinar qué eventos serán útiles o imprescindibles para controlar completamente el proceso oncológico. Y en este punto, nuestro grupo de trabajo ha intentado buscar esos marcadores que puedan explicar mejor esta evolución y su control.

Pero si algo caracteriza al control de un proceso infeccioso o de una infección, es el conocimiento de su distribución y la importancia de la misma: en qué lugares aparece, en qué tipo de individuos, qué características se repiten en los mismos y qué comportamientos o actuaciones se deben llevar a cabo para evitar la progresión de la enfermedad.

Por eso, el primer reto al que nos enfrentamos es conocer dónde se encuentra la infección, con qué características y en qué población.

El primer estudio de esta tesis centra sus objetivos en conocer la prevalencia de los genotipos de AR del VPH en mujeres con sintomatología relacionada y nos proporciona datos de la distribución local de genotipos de VPH en mujeres no vacunadas diagnosticadas de CIN2+ en Galicia. Como era de esperar, el VPH16 se encontró en la mayoría de los casos de displasia cervical, especialmente en lesiones escamosas de alto grado, donde más del 60 % de los casos se relacionaron con este genotipo, tal y como han publicado otros autores en un estudio de pacientes europeas con enfermedad invasiva (de Sanjose *et al.*, 2010; Tjalma *et al.*, 2012).

El segundo genotipo más prevalente fue VPH31, tal y como se había descrito en casos de CIN2 y CIN3-CIS en un estudio previo en España (Tjalma *et al.*, 2012), aunque con una frecuencia mayor que la descrita previamente (Mazarico y Gonzalez-Bosquet, 2012). Esta diferencia podría ser atribuible a la proporción relativa de casos de CIN2 incluidos en el trabajo que se presenta.

Los ocho genotipos de VPH más comúnmente encontrados en el cáncer de cuello uterino invasivo en todo el mundo (VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH45, VPH52 y VPH58) se estudiaron como un grupo aparte y fueron los únicos detectados en los casos de AIS y CES y un 90 % de los casos de CIN3-CIS, confirmando su importancia en dicha patología.

Con menor prevalencia que VPH16 y VPH31 se encontraron otros 17 genotipos distintos, donde cabe destacar la presencia de VPH33 y VPH45, la mayoría dentro del grupo alfa-9 relacionado estrechamente con VPH16 y con cierto poder oncogénico, por lo que su seguimiento debe ser estrecho para tomar decisiones adecuadas.

Actualmente se realiza en Galicia un cribado citológico en el que se derivan a colposcopia todas aquellas mujeres con alteraciones citológicas ya sean de alto o de bajo grado y aquellas mujeres con alteraciones citológicas de significado indeterminado en las que se detecta la presencia de cualquier genotipo de VPH de AR. Dada la sensibilidad y especificidad de este cribado, numerosos estudios se están realizando para encontrar nuevas estrategias que

mejoren la relación coste-beneficio del cribado de cáncer cervical. Debido a que la prevalencia de VPH31 en CIN2+ y de VPH33 y VPH45 en CIN3+ es alta, podría ser interesante evaluar el coste-efectividad de realizar colposcopia tras la detección de estos genotipos, independientemente del resultado de la citología, como ya fue sugerido previamente (Rijkaart *et al.*, 2012).

En cuanto a los factores que se relacionaron con las lesiones invasivas, se pudo comprobar que la edad es una variante importante que se debe tener en cuenta. Los casos invasivos se detectaron en mujeres más jóvenes cuando se relacionaron con VPH16 y VPH18, tal como ya fue descrito (de Sanjose *et al.*, 2010; Tjalma *et al.*, 2012). En las lesiones escamosas, la prevalencia de VPH16 fue mayor en el grupo de mujeres menores de 45 años de edad. En otros estudios también se observó este descenso en la detección de VPH16 con la edad y el correspondiente aumento de aparición de otros genotipos (Kasamatsu *et al.*, 2012; Porras *et al.*, 2009). Si tenemos en cuenta solo a ese grupo de mujeres más jóvenes con lesiones escamosas, la prevalencia de VPH16 también aumentó con la severidad de las lesiones (CIN3-CIS/CES). Así pues, los esfuerzos encaminados a controlar la infección de estos genotipos parecen estar bien fundamentados al incidir en la población de una edad media y también serían de utilidad en nuestro entorno.

Las mujeres incluidas en el primer trabajo pertenecían a la población general que acudía a una unidad ginecológica de cuello de útero para el cribado de cáncer cervical. Se analizaron los datos epidemiológicos de la población estudiada para poder descartar cualquier sesgo y saber si las conclusiones son representativas de la población local. La edad media de inicio de relaciones sexuales fue inferior (y por lo tanto con la posibilidad de más parejas sexuales) a lo descrito previamente por otros autores (de Sanjose *et al.*, 2008). Esto podría ser atribuible al año de nacimiento de las mujeres que respondieron el cuestionario (1957-1991) pero también a las características geográficas.

Fue destacable que el 42 % de las mujeres con CIN2+ incluidas en este estudio habían tenido más de cinco compañeros sexuales a lo largo de su vida, lo que se relaciona con un riesgo relativo de CES y AC encontrado en mujeres con más de seis parejas a lo largo de la vida (Berrington de González y Green, 2007) y contrasta con el porcentaje encontrado en otros trabajos realizados sobre otras poblaciones (11.8 % según la estadística SICRI o el 5.9 % en el estudio AFRODITA) (de Sanjose *et al.*, 2008).

El mayor número de casos de lesión por VPH se detectó en mujeres entre 30 y 40 años. Este dato está en concordancia con las tendencias de lesiones cervicales de alto grado previamente publicadas donde se observó un pico en la incidencia de lesiones cervicales en menores de 30 años de edad en América del Norte, pero refleja una mayor edad que en Europa donde se puede observar un nivel máximo de infección a los 25 años (Ting *et al.*, 2010). Esto también está relacionado con la prevalencia edad-específica de genotipos de VPH-AR descrita recientemente en España. Estos autores estudiaron la población general no vacunada y encontraron que la prevalencia de VPH era máxima a la edad de 18-25 años y disminuía en mujeres mayores (Castellsagué *et al.*, 2012).

Los casos invasivos fueron poco frecuentes y correspondieron a las pacientes de mayor edad como sería esperable en una población con un programa de cribado de cáncer cervical. Sin embargo, cuatro casos de CIN2 y dos casos de CIN3-CIS fueron detectados en mujeres muy jóvenes (menos de 25 años de edad).

Aunque el papel de los tipos carcinógenos más frecuentes en el cáncer cervical en el mundo ha sido bien establecido, la capacidad oncogénica de los genotipos de VPH menos frecuentes o su papel en infecciones múltiples todavía está en estudio. Refiriéndonos a datos crudos, los genotipos de VPH de alto riesgo no vacunales más frecuentes (protección directa o cruzada) fueron el 51, 52, 35, 56 y 58. No se espera que su prevalencia cruda se modifique por la introducción de la vacuna, pero su contribución relativa al CIN2+ podría verse aumentada y por

lo tanto el impacto de la vacunación podría ser diferente de lo estimado. Las nuevas vacunas deberán tener en cuenta estos datos.

Desde la aparición de las vacunas, Galicia tomó una postura activa para su implantación. Para la primera cohorte vacunada en Galicia (mujeres nacidas en 1994) la cobertura local de la vacunación frente a VPH16 y VPH18 fue satisfactoria (80 % con 1-3 dosis; 71.4 % con 3 dosis). Los cálculos del impacto esperado de la vacunación se han realizado utilizando datos de eficacia vacunal observados en ensayos clínicos. Recientemente ha sido publicada una alta efectividad de la vacuna frente a la infección por los genotipos vacunales (Markowitz *et al.*, 2013). Varios factores como la protección de grupo o la efectividad de la vacuna tras una serie incompleta de vacunación podrían modificar el impacto de la vacunación. Según las estimaciones realizadas con los datos presentados, el impacto vacunal esperado sería alto, ya que supondría una disminución del 50.6 % en la incidencia acumulada de CIN2+ y del 54.5 % en la incidencia acumulada de CIN3+; este impacto sería incluso mayor (62.7 % y 66.4 %, respectivamente) si se tuviese en cuenta también la eficacia vacunal cruzada. Estos datos están en concordancia con el impacto esperado sobre el cáncer cervical invasivo (Alemany *et al.*, 2012) y el HSIL en España publicado recientemente por otros autores (Martín *et al.*, 2011).

Es importante destacar que la duración de la eficacia de la protección directa y cruzada es desconocida. Algunos autores han sugerido un potencial descenso del efecto de la protección cruzada de la vacuna bivalente con el tiempo (Malagón *et al.*, 2012; Wheeler *et al.*, 2012). La duración de la protección frente a los tipos de VPH vacunales y no vacunales tendrá un importante efecto sobre las consecuencias de la vacunación a largo plazo, dato que habrá que evaluar en el futuro. De hecho, ya se sugieren dosis de recuerdo para mantener altos los niveles de protección.

Basándonos en la evidencia actual, las prácticas recomendadas de cribado no deben cambiar para las mujeres vacunadas frente a VPH16 y VPH18. Se estima que al menos un 34 % de CIN2+

no es prevenible con las vacunas actualmente disponibles por estar causado por genotipos no vacunales. Tampoco existen datos todavía que apoyen cambios en la edad de inicio del cribado. En este momento, se conoce poco acerca del efecto real de la vacunación sobre la distribución de los genotipos del VPH y la efectividad vacunal (Markowitz *et al.*, 2013). El rendimiento de la citología y la detección del VPH -los dos métodos recomendados para cribado (Saslow *et al.*, 2012)-, la duración de la protección y la adherencia al cribado tras la vacunación son todavía desconocidos. Será necesario conocer en nuestra población el porcentaje de vacunación completa a una edad en la que sea probable que no se haya expuesto al VPH. Serán cruciales los sistemas de vigilancia que incluyan registros de CIN3 y Papanicolaou y monitorización tipo-específica de los casos de CIN2+. La detección de los genotipos no vacunales podría ser importante en el cribado tipo específico, particularmente en las mujeres mayores de 45 años de edad en Galicia.

Dado que las anomalías cervicales más graves detectadas por la citología, la detección de VPH y la colposcopia son causadas por el VPH16, el valor predictivo positivo para CIN2+ de estos tres métodos descenderá en las mujeres vacunadas. En Galicia, el riesgo de CIN2+ en mujeres menores de 45 años de edad debería estar relacionado preferentemente con VPH16, así que si los datos demuestran reducciones en el riesgo de cáncer para las mujeres vacunadas, puede ser razonable retrasar el inicio del cribado hasta los 25 años. Además, podría ser adecuado ampliar el intervalo de cribado si la eficacia a largo plazo de la vacuna se demuestra y si se incorpora la detección de VPH en el cribado primario.

Si se tiene en cuenta que la vacunación todavía no ha podido tener una repercusión en los resultados del cribado realizado en la actualidad, los VPH16 y VPH18 siguen siendo los genotipos que mayor preocupación generan. Considerando los datos mundiales descritos en la literatura sobre la importancia de estos genotipos, el segundo estudio nos aporta datos de la prevalencia de linajes y sublinajes de los VPH16 y VPH18 en Galicia, basados en el análisis de

parte de las regiones LCR y E6, unos fragmentos que han demostrado ser capaces de diferenciar entre todos los sublinajes de estos genotipos, con el fin de aportar nuevos datos en la gravedad de la infección.

Entender la base genética de la especial carcinogenicidad de algunos linajes de VPH16 y VPH18 podría ayudarnos a descubrir interacciones entre el virus y el hospedador que podrían ser importantes para mejorar el control de la infección por VPH y del cáncer cervical. Hasta el momento se han publicado pocos estudios epidemiológicos referidos a linajes de VPH en la población española (Arroyo *et al.*, 2012; Godínez *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2006; Pérez-Gallego *et al.*, 2001) y solo uno de ellos se refiere al VPH18. En un estudio de casos y controles multicéntrico reciente se observó que la distribución de los linajes de VPH16 en el mundo y su riesgo relativo de cáncer cervical podría depender de las características geográficas y étnicas de la población (Cornet *et al.*, 2013), así que parece interesante aportar datos de una zona geográfica específica.

Respecto al VPH18, no hay evidencia acerca del papel de los linajes en la patogénesis del cáncer. Aunque VPH18 es el segundo genotipo más frecuente en el cáncer cervical (después del VPH16) es mucho menos prevalente que el VPH16 y las lesiones precancerosas relacionadas con el VPH18 se detectan con poca frecuencia por lo que los estudios de progresión no son fáciles de realizar. En la población estudiada, se detectaron dos linajes de VPH18 (A y B), aunque la mayoría de los virus se agruparon en el linaje A, como era esperable en España (Arroyo *et al.*, 2012). Dichos linajes se detectaron tanto en casos como en controles, lo que contrasta con lo encontrado en otro estudio español (Arroyo *et al.*, 2012) en el que el único linaje presente en casos de alteraciones citológicas de alto grado fue el linaje africano (linajes B/C). Esto puede sugerir que Galicia tenga una distribución diferente y que se encuentren poblaciones distintas al resto de España.

En un análisis más detallado, ciertos autores encontraron variaciones en el nucleótido 104 que se asociaron a una mayor actividad del promotor E6/E7 (Rose *et al.*, 1997). Por otra parte, los sublinajes A1 y A2 del VPH18 podrían tener una mayor capacidad para inducir la formación de tumores *in vivo* (De la Cruz-Hernández *et al.*, 2005). Algunos autores comunicaron un mayor riesgo del linaje A (Xi *et al.*, 2007). En este estudio, el linaje B (104T) parece estar asociado con un riesgo incrementado de CIN3+ comparado con el linaje A, pero esta asociación no fue significativa, probablemente debido al pequeño número de pacientes incluidos.

Con respecto al VPH16, en la población estudiada se detectaron los cuatro linajes descritos. El linaje A fue predominante, tal y como se esperaba que sucediese (Cornet *et al.*, 2013) y de ahí su frecuente aparición en todos los subgrupos clínicos establecidos. El linaje D fue el segundo más frecuente. Existe evidencia sólida de que los sublinajes no europeos de VPH16 poseen un elevado riesgo de cáncer. En concreto, el linaje D se ha asociado previamente con el riesgo de CIN3+ (Berumen *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2011; Zuna *et al.*, 2009). También se ha observado recientemente (Smith *et al.*, 2011) que el sublinaje D2 (AA2) podría tener un riesgo incrementado de CIN3+. En la población estudiada, el linaje D se asoció con un riesgo de CIN3+ tres veces mayor que el linaje A. El linaje D también se asoció con un mayor riesgo de lesiones invasivas y glandulares de alto grado que el linaje A. Dado que la asociación del linaje D con un mayor riesgo de lesiones escamosas de alto grado en comparación con el linaje A no fue significativa, los resultados comentados para los casos de CIN3+ VPH16 positivos podrían estar influenciado por las lesiones glandulares e invasivas incluidas en este grupo histológico.

En el grupo de pacientes infectadas por el linaje D de VPH16, la media de edad al inicio del estudio de los casos de CIN3+ fue mayor que la media de edad del grupo control. Esto podría ser explicado por la asociación de este linaje con las lesiones glandulares y la dificultad para diagnosticar dichas lesiones al inicio de las mismas. Las pacientes con infección por VPH16 que

presentaban lesiones glandulares de alto grado fueron mayores que aquellas que presentaban lesiones escamosas de alto grado (47 años frente a 35 años).

Para el análisis de datos de VPH16, se han combinado casos de CIN3+ procedentes de un estudio prospectivo con casos de CIN3+ extraídos de la misma población en un período diferente de tiempo para incrementar el poder analítico. Las diferencias de las poblaciones en cuanto a la edad, proporción de CIN3, de lesiones glandulares de alto grado o del linaje D no fueron significativas entre ambos grupos, lo que avala la combinación de todos estos casos.

Un factor que puede influir en la gravedad de la infección por VPH16 es su coinfección con otros virus como el VIH-1. La prevalencia de VIH en este estudio fue baja, del 3 %, pero se aprecia un incremento de la severidad de la infección. Dada la relación entre el VIH y el VPH en el cáncer cervical, podría ser interesante considerar la coinfección por VIH en futuros estudios de riesgo de cáncer cervical de linajes de VPH.

El análisis de linajes en diferentes regiones genómicas (LCR, E6) fue concordante, por lo que los aislamientos estudiados no parecen ser producto de recombinación genética entre virus de diferentes linajes. Por lo tanto, para utilizar una metodología más simple, un único fragmento podría proporcionar la suficiente información. Se ha descrito que la presencia de múltiples variantes de VPH16 en una misma mujer es rara (Geraets *et al.*, 2013) y ha sido incluso menor en este estudio. Estas discrepancias podrían ser debidas a diferencias en la sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados para el análisis de variantes. La secuenciación de Sanger es un método poco sensible para detectar variantes minoritarias, con una sensibilidad de aproximadamente el 25 % para poblaciones minoritarias.

La región L1, estudiada de forma individual, aporta información limitada del linaje viral pero podría ser útil si cambios específicos en esta región estuviesen relacionados con la severidad de las lesiones. Un fragmento de la región L1 del VPH16, utilizada habitualmente para la detección de VPH-AR en muestras clínicas, fue secuenciado en un número limitado de

pacientes previamente caracterizados mediante secuenciación de la región LCR-E6. En este estudio, se identificaron ocho sustituciones aminoacídicas. Los dos SNPs no sinónimos más comunes encontrados en la región L1 fueron A6695C y A6803T. Uno de ellos, A6695C provoca la sustitución de treonina (Thr) en la posición 353 por prolina (Pro). El polimorfismo A6803T que provoca la sustitución de treonina (Thr) por serina (Ser) en la posición 389 se presentó en muestras que agruparon en el linaje D en este estudio. La detección del polimorfismo A6803T se asoció con un riesgo incrementado de lesiones glandulares de alto grado y lesiones invasivas comparados con la detección de A6803. Podría ser interesante llevar a cabo estudios posteriores para investigar la utilidad de la detección específica de este SNP utilizando métodos más rápidos y baratos que la secuenciación de ácidos nucleicos. La incorporación de la detección de un SNP específico de linaje a los métodos actuales de genotipado basados en la detección de la región L1 podría ayudar a profundizar en el conocimiento del riesgo de CIN3+ del VPH16.

El subtipado de VPH16 dentro de un área geográfica específica mediante secuenciación de la región LCR-E6 a menudo conduce a muchas secuencias largas idénticas en las cuales solo unos pocos puntos específicos resultan de interés (Yamada *et al.*, 1997). En el tercer estudio se diseñó un ensayo para el genotipado del SNP más frecuentemente encontrado en la secuenciación de esta región del VPH16, independientemente de su rama filogenética: T350G. Este polimorfismo se ha sugerido como factor de riesgo de enfermedad cervical avanzada por ciertos investigadores (Berumen *et al.*, 2001; Grodzki *et al.*, 2006; Zehbe *et al.*, 1998; Zuna *et al.*, 2009). Este polimorfismo conlleva un cambio en el aminoácido 83 de la oncoproteína E6. Este aminoácido está rodeado de otros altamente conservados S-L/V-Y-G, los cuales son idénticos en los tipos VPH-AR pero diferentes en los tipos de bajo riesgo VPH6 y VPH11 (AGYA y AAYA, respectivamente). Es razonable asumir que podría ser un sitio con capacidad de influir en la transformación de la proteína viral E6 en los VPH-AR.

El uso del análisis de SNPs se está extendiendo cada vez más para caracterizar y diferenciar virus dado el tiempo y el trabajo que requiere la secuenciación convencional de ácidos nucleicos. En comparación con el ensayo de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) descrito para la detección específica de esta variante (Alemi *et al.*, 1999) es más rápida y no requiere electroforesis en gel de poliacrilamida. Además permite detectar fácilmente mezclas de dos nucleótidos en la misma posición.

Este método fue desarrollado inicialmente con estándares y con 102 muestras clínicas que contenían variantes conocidas de VPH16. El límite de detección fue de 50 copias para la cepa de referencia y la variante T350G. Se observó una correlación completa entre los resultados obtenidos mediante este test de discriminación alélica en tiempo real y la PCR convencional seguida de secuenciación. No se encontraron uniones inespecíficas con las sondas. Este ensayo mostró su utilidad para detectar la mutación en la posición 350 de E6, incluso en casos de coinfección en muestras clínicas, donde las características de la muestra podrían haber comprometido el ensayo.

Para evaluar la relación entre las variantes T350G de VPH16 y la actividad oncogénica de este genotipo, se consideró interesante aplicar este nuevo método en 32 muestras de mujeres con CIN2+. En este grupo, la mutación T350G fue una mutación común, encontrada en más del 50 % de los casos. Otros investigadores han encontrado esta mutación en muestras de cáncer cervical con frecuencias diferentes: 29.6 % (Pista *et al.*, 2007), 47 % (Zuna *et al.*, 2009), 70 % (Pande *et al.*, 2008), 88.2 % (Zehbe *et al.*, 1998), 93.3 % (Berumen *et al.*, 2001). Las características de las mujeres incluidas (edad, raza, características sociodemográficas) y el hecho de que los linajes de VPH se distribuyen de forma diferente según la región geográfica, podrían explicar estos resultados diferentes. Esto también subraya la importancia de realizar estudios locales para determinar la distribución de la variante T350G del E6.

Considerando los casos de CIN2+ incluidos en el tercer estudio, la media de edad de las mujeres infectadas por la variante T350G de VPH16 fue 10 años menor que la de las mujeres infectadas por la cepa prototipo (T350). Sin embargo estas diferencias no se encontraron al analizar los casos de CIN2+ en mujeres infectadas por el linaje europeo del VPH16 en el segundo estudio. Dichas diferencias podrían estar relacionadas con una distribución desigual de lesiones invasivas entre los grupos comparados.

Los estudios de casos y controles y los estudios longitudinales podrían ayudar a aclarar la contribución de esta variante a la progresión de las lesiones cervicales. En el segundo estudio no se encontraron diferencias en la prevalencia de este polimorfismo entre casos y controles, posiblemente porque el número de pacientes fue limitado. Por ello, y dado que la implicación de la variante europea T350G en la persistencia viral y en la progresión de la enfermedad permanece sin aclarar, este ensayo de discriminación alélica en tiempo real podría ser utilizado en estudios a gran escala, especialmente en poblaciones con baja incidencia de los linajes no europeos de VPH16. Además, se podría utilizar otro método rápido complementario para discriminar entre variantes con la mutación T350G del linaje europeo y de otros linajes. También podría ser una herramienta útil para obtener datos precisos acerca de infecciones recurrentes o nuevas en estudios epidemiológicos de infección y persistencia.

También podría ser interesante considerar otros factores virales y del huésped (la carga viral, la coinfección con otros genotipos de VPH-AR, la integración viral, el ARNm, los linajes, el tipado HLA de las pacientes) para determinar la importancia clínica de la variante T350G del gen E6 o de otras variantes como las encontradas en el estudio anterior de los linajes del VPH16.

En este sentido, en el cuarto estudio se evaluó la eficacia de un ensayo comercial de detección de ARNm (NucliSENS EasyQ) para la detección de CIN2+ como posible marcador de gravedad de la infección. En el trabajo, se incluyeron mujeres con detección de ADN de VPH16

y/o VPH18 en infección única. Algunas opciones de manejo de la infección incluyen colposcopia directa en caso de detección de cualquiera de estos dos genotipos, independientemente del resultado de la citología. Si la introducción de un nuevo marcador de progresión como el ARNm pudiese mejorar la especificidad, podría disminuirse el número de colposcopias al menos en el caso de ciertos diagnósticos citológicos. Restringir el ensayo a la búsqueda de ARNm de VPH16 o VPH18 permitiría realizar un mejor análisis de su relación con la progresión clínica.

Los datos del estudio mostraron que el porcentaje de detección de ARNm se incrementó con la severidad de las lesiones, como fue publicado anteriormente (Arbyn *et al.*, 2009; Benevolo *et al.*, 2011b; Sjoeborg *et al.*, 2010; Sotlar *et al.*, 2004; Tropé *et al.*, 2009). La ausencia de transcripción de ADN, más frecuente en caso de citología sin lesión o ASC-US o LSIL refleja posiblemente un estado episomal del virus y una regulación transcripcional eficaz y también una mayor probabilidad de que la infección se aclare espontáneamente que en el caso de HSIL.

Entre las pacientes derivadas a colposcopia, aunque la sensibilidad para la detección de CIN2+ se conservó, se consideró adecuado presentar los valores predictivos estratificados por grado de lesión citológica debido a que tanto el VPN como el VPP se relacionaron con la prevalencia de CIN2+. Tal como se esperaba, el VPN fue mayor en el grupo de pacientes con ASC-US o LSIL y el VPP lo fue en el grupo de pacientes con HSIL.

En el 35 % de mujeres pertenecientes al grupo de ASC-US/LSIL que tuvieron un resultado de ARNm positivo no se llegó a demostrar lesión histológica de alto grado en la biopsia tomada en un período máximo de 7 meses. Esto puede ser explicado, en parte, por el hecho de que la biopsia colposcópica no detecta un tercio de las lesiones prevalentes de grado moderado o peor (Jeronimo and Schiffman, 2006; Stoler *et al.*, 2011; Zuchna *et al.*, 2010). Es decir, los casos de detección de ARNm sin diagnóstico histológico confirmatorio de lesión de alto grado pueden realmente representar un fallo de la histología debido a que la lesión sea pequeña o

que la biopsia no sea representativa de la lesión verdadera. Cuando el análisis de datos se realizó con un seguimiento de 18 meses en el grupo de citología negativa, la especificidad y el VPP del ensayo NucliSENS EasyQ fueron más elevados, manteniendo una sensibilidad y un VPN similares para una prevalencia de CIN2+ algo mayor.

Algunos autores han publicado que las diferencias en la exactitud diagnóstica entre los ensayos basados en NASBA y los ensayos basados en detección de ADN convencionales no parece que sean atribuibles a la amplificación más específica del ARNm viral sino al rango limitado de tipos virales detectados (Burger *et al.*, 2011; Ovestad *et al.*, 2011) y a una sensibilidad analítica inferior (Boulet *et al.*, 2010). Este último autor incluso ha identificado ADN de doble cadena viral como una posible diana para los test de detección de ARNm de VPH basados en NASBA. El estudio intentó minimizar estos posibles inconvenientes con un procedimiento de extracción de ARN específico e incluyendo solo mujeres infectadas con genotipos incluidos en el ensayo. Es muy improbable que los casos de CIN2+ con ARNm negativo detectados en este estudio se deban a infección por otros genotipos de VPH no incluidos en el ensayo ya que se detectó ADN de VPH16 y/o VPH18 en cada paciente en el momento de la inclusión. Quizás estos resultados discordantes puedan haber sido debidos a un nivel de transcripción muy bajo, no detectado por el test.

Basándonos en su elevado VPN, en mujeres ADN positivas diagnosticadas de ASC-US o LSIL, el ensayo NucliSENS EasyQ utilizado como test complementario podría reducir el número de mujeres derivadas a colposcopia drásticamente, aunque perdiendo sensibilidad. Este resultado está en concordancia con otros informes publicados previamente (Benevolo *et al.*, 2011a; Cattani *et al.*, 2009; Halfon *et al.*, 2010).

En las mujeres ADN positivas diagnosticadas de HSIL, el VPP fue tan elevado que un resultado positivo de NucliSENS EasyQ podría eliminar la biopsia confirmatoria de lesiones de

alto grado que de rutina se realiza antes de la conización en la población estudiada, como otros autores han propuesto (Koliopoulos *et al.*, 2012; Sørbye *et al.*, 2010).

Actualmente no hay estudios publicados que utilicen NucliSENS EasyQ, u otro test que detecte ARNm, como test primario en el cribado de cáncer cervical, pero podría ser muy útil para la selección de mujeres con mayor riesgo de progresión en caso de detección de VPH16 y/o VPH18 y citología negativa dada su elevada sensibilidad y especificidad para la detección de CIN2+. En el momento actual para un correcto seguimiento de las pacientes con detección de VPH-AR y citología negativa se requieren revisiones frecuentes. Esto requiere un elevado cumplimiento por parte de las pacientes, difícil de alcanzar. La inclusión de la detección de ARNm en el seguimiento de la infección por VPH podría reducir el número de visitas. Según este estudio, la presencia de ADN del VPH16 o VPH18, en ausencia de ARNm y con citología normal permite espaciar el seguimiento al menos a los 18 meses con toda seguridad.

La principal limitación en todos los estudios fue el tamaño muestral que restringió el análisis de ciertos diagnósticos histológicos de lesiones cervicales, de los genotipos menos frecuentes y de ciertos linajes que no se encuentran frecuentemente en Europa. El número de pacientes que aportaron datos epidemiológicos con el cuestionario voluntario también fue reducido. Como consecuencia, el análisis estadístico tuvo que referirse a agrupaciones de diagnósticos y sublinajes y, principalmente, al genotipo 16. Esto también puede haber alterado la atribución de genotipos en ciertos casos del primer estudio. Sería interesante realizar estudios colaborativos incluyendo un gran número de pacientes para confirmar los resultados obtenidos.

En cuanto a los estudios que evaluaron la evolución clínica de las pacientes, no se tomó en consideración la detección previa de VPH o de alteraciones citológicas, lo que podría haber alterado los porcentajes de progresión observados. Además, el seguimiento clínico se extendió durante un tiempo limitado por lo que es posible que algunas pacientes incluidas en el grupo

control o de no progresión podrían haber progresado en un período de seguimiento mayor. Se utilizaron dos métodos diferentes para el genotipado de VPH-AR, lo que podría suponer diferencias en la detección de VPH16 y VPH18.

Otras limitaciones del estudio son derivadas de las propias limitaciones del conocimiento científico actual: es difícil calcular el impacto real de la vacuna hasta que la duración de su protección sea bien establecida y la contribución de los genotipos en coinfección se pueda evaluar. En el estudio de ARNm, se desconoce la influencia que pueden haber tenido otros genotipos en coinfección; teóricamente, debido al método inicial de detección, se asumió que los genotipos 16 y 18 eran predominantes en todos los casos de infecciones mixtas incluidas.

En cualquier caso, los datos expuestos permiten disponer de un mejor conocimiento de la prevalencia de los genotipos del VPH en Galicia y de los linajes circulantes de los tipos 16 y 18, y han proporcionado datos esperanzadores e interesantes en cuanto a nuevos marcadores genómicos relacionados con la gravedad de la infección.

6 CONCLUSIONES

1. El VPH16 es el genotipo más frecuente en casos diagnosticados histológicamente de CIN2+; sin embargo, otros genotipos no incluidos en la vacuna como VPH31, VPH33, VPH35, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56 y VPH58 también son comunes, sugiriendo que el desarrollo de nuevas vacunas frente a un elevado número de genotipos es necesario.
2. Debido a la alta prevalencia del VPH16 en lesiones malignas en mujeres menores de 45 años, la vacunación frente al VPH será efectiva en este grupo de mujeres.
3. El linaje más frecuente del VPH16 fue el linaje A. Sin embargo, el linaje D del VPH16 se asoció a un mayor riesgo de CIN3+, de lesiones glandulares de alto grado y de lesiones invasivas.
4. El linaje A del VPH18 fue predominante, aunque el linaje B de este genotipo podría conferir un mayor riesgo de CIN3+.
5. La presencia del polimorfismo A6803T localizado en la región L1 de VPH16 se asoció con un mayor riesgo de lesiones glandulares de alto grado e invasivas.
6. El nuevo ensayo de discriminación alélica de desarrollo propio es sensible y específico para detectar la mutación T350G en el gen E6 de VPH16.
7. La aplicación de este ensayo en muestras endocervicales permite la detección de VPH16 y la mutación T350G a la vez en menos de cuatro horas, lo que lo hace útil para la vigilancia y confirmación de persistencia de esta variante de VPH16.
8. El ensayo NucliSENS EasyQ® HPV fue útil como marcador viral de progresión en caso de detección de ADN de VPH16 y/o VPH18.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aleman, L., Pérez, C., Tous, S., Llombart-Bosch, A., Lloveras, B., Lerma, E., Guarch, R., Andújar, M., Pelayo, A., Alejo, M., Ordi, J., Klaustermeier, J., Velasco, J., Guimerà, N., Clavero, O., Castellsagué, X., Quint, W., Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjosé, S., 2012. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol. Oncol.* 124, 512–517. doi:10.1016/j.ygyno.2011.11.024
- Alemi, M., Andersson, S., Sällström, J., Wilander, E., 1999. Rapid test for identification of a human papillomavirus 16 E6 L83V variant. *Diagn. Mol. Pathol.* 8, 97–100.
- Arbyn, M., Martin-Hirsch, P., Buntinx, F., Van Ranst, M., Paraskevaidis, E., Dillner, J., 2009. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: a meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 648–659. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00631.x
- Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., Meijer, C.J.L.M., Poljak, M., Ogilvie, G., Koliopoulos, G., Naucler, P., Sankaranarayanan, R., Peto, J., 2012. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 30 Suppl 5, F88–99. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.095
- Arias-Pulido, H., Peyton, C.L., Torrez-Martínez, N., Anderson, D.N., Wheeler, C.M., 2005. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. *Virology* 338, 22–34. doi:10.1016/j.virol.2005.04.022
- Arroyo, S.L., Basaras, M., Arrese, E., Hernández, S., Andía, D., Esteban, V., Garcia-Etxebarria, K., Jugo, B.M., Cisterna, R., 2012. Human Papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Viol. J.* 9, 258. doi:10.1186/1743-422X-9-258
- Benevolo, M., Terrenato, I., Mottolese, M., Marandino, F., Carosi, M., Rollo, F., Ronchetti, L., Muti, P., Mariani, L., Sindico, S., Vocaturo, G., Vocaturo, A., 2011a. Diagnostic and prognostic validity of the human papillomavirus E6/E7 mRNA test in cervical cytological samples of HC2-positive patients. *Cancer Causes Control* 22, 869–875. doi:10.1007/s10552-011-9757-0
- Benevolo, M., Vocaturo, A., Caraceni, D., French, D., Rosini, S., Zappacosta, R., Terrenato, I., Ciccocioppo, L., Frega, A., Giorgi Rossi, P., 2011b. Sensitivity, specificity, and clinical value of human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA assay as a triage test for cervical cytology and HPV DNA test. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2643–2650. doi:10.1128/JCM.02570-10
- Berrington de González, A., Green, J., 2007. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual

- data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int. J. Cancer* 120, 885–891. doi:10.1002/ijc.22357
- Berumen, J., Ordoñez, R.M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S.C., Estrada, R.A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G., Madrigal-de la Campa, A., 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1325–1330.
- Boulet, G.A.V., Micalessi, I.M., Horvath, C.A.J., Benoy, I.H., Depuydt, C.E., Bogers, J.J., 2010. Nucleic acid sequence-based amplification assay for human papillomavirus mRNA detection and typing: evidence for DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2524–2529. doi:10.1128/JCM.00173-10
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., Cogliano, V., 2009. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 10, 321–322.
- Bulkmans, N.W.J., Berkhof, J., Rozendaal, L., van Kemenade, F.J., Boeke, A.J.P., Bulk, S., Voorhorst, F.J., Verheijen, R.H.M., van Groningen, K., Boon, M.E., Ruitinga, W., van Ballegooijen, M., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2007. 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, 1764–1772. doi:10.1016/S0140-6736(07)61450-0
- Burger, E.A., Kornør, H., Klemp, M., Lauvrak, V., Kristiansen, I.S., 2011. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol. Oncol.* 120, 430–438. doi:10.1016/j.ygyno.2010.11.013
- Burk, R.D., Harari, A., Chen, Z., 2013. Human papillomavirus genome variants. *Virology* 445, 232–243. doi:10.1016/j.virol.2013.07.018
- Burk, R.D., Terai, M., Gravitt, P.E., Brinton, L.A., Kurman, R.J., Barnes, W.A., Greenberg, M.D., Hadjimichael, O.C., Fu, L., McGowan, L., Mortel, R., Schwartz, P.E., Hildesheim, A., 2003. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res.* 63, 7215–7220.
- Carozzi, F., Gillio-Tos, A., Confortini, M., Del Mistro, A., Sani, C., De Marco, L., Girlando, S., Rosso, S., Naldoni, C., Dalla Palma, P., Zorzi, M., Giorgi-Rossi, P., Segnan, N., Cuzick, J., Ronco, G., NTCC working group, 2013. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 14, 168–176. doi:10.1016/S1470-2045(12)70529-6

- Castellsagué, X., Iftner, T., Roura, E., Vidart, J.A., Kjaer, S.K., Bosch, F.X., Muñoz, N., Palacios, S., San Martín Rodríguez, M., Serradell, L., Torcel-Pagnon, L., Cortes, J., 2012. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J. Med. Virol.* 84, 947–956. doi:10.1002/jmv.23282
- Cattani, P., Siddu, A., D’Onghia, S., Marchetti, S., Santangelo, R., Vellone, V.G., Zannoni, G.F., Fadda, G., 2009. RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2136–2141. doi:10.1128/JCM.01733-08
- Cornet, I., Gheit, T., Iannaccone, M.R., Vignat, J., Sylla, B.S., Del Mistro, A., Franceschi, S., Tommasino, M., Clifford, G.M., 2013. HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br. J. Cancer* 108, 240–244. doi:10.1038/bjc.2012.508
- Cubie, H.A., 2013. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* 445, 21–34. doi:10.1016/j.virol.2013.06.007
- De Boer, M.A., Peters, L.A.W., Aziz, M.F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M.A., Jordanova, E.S., Fleuren, G.J., 2005. Human papillomavirus type 18 variants: histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *Int. J. Cancer* 114, 422–425. doi:10.1002/ijc.20727
- De Boer, M.A., Peters, L.A.W., Aziz, M.F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M.A., Jordanova, E.S., Kolkman-Uljee, S., Fleuren, G.J., 2004. Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecol. Oncol.* 94, 488–494. doi:10.1016/j.ygyno.2004.05.037
- De la Cruz-Hernández, E., García-Carrancá, A., Mohar-Betancourt, A., Dueñas-González, A., Contreras-Paredes, A., Pérez-Cardenas, E., Herrera-Goepfert, R., Lizano-Soberón, M., 2005. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J. Gen. Virol.* 86, 2459–2468. doi:10.1099/vir.0.80945-0
- De Sanjose, S., Cortés, X., Méndez, C., Puig-Tintore, L., Torné, A., Roura, E., Bosch, F.X., Castellsagué, X., 2008. Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population Results from the AFRODITA survey. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140, 234–240. doi:10.1016/j.ejogrb.2008.04.005
- De Sanjose, S., Quint, W.G., Alemany, L., Geraets, D.T., Klaustermeier, J.E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L.E., Shin, H.-R., Vallejos, C.S., de Ruiz, P.A., Lima, M.A., Guimera, N., Clavero, O., Alejo, M., Llombart-Bosch, A., Cheng-Yang, C., Tatti, S.A., Kasamatsu, E., Iljazovic, E., Odida, M., Prado, R., Seoud, M., Grce, M., Usubutun, A., Jain, A., Suarez, G.A.H., Lombardi, L.E., Banjo, A., Menéndez, C., Domingo, E.J., Velasco, J., Nessa, A., Chichareon, S.C.B., Qiao, Y.L., Lerma, E., Garland, S.M., Sasagawa, T., Ferrera, A., Hammouda, D., Mariani, L., Pelayo, A., Steiner, I., Oliva, E., Meijer, C.J., Al-Jassar, W.F.,

- Cruz, E., Wright, T.C., Puras, A., Llave, C.L., Tzardi, M., Agorastos, T., Garcia-Barriola, V., Clavel, C., Ordi, J., Andújar, M., Castellsagué, X., Sánchez, G.I., Nowakowski, A.M., Bornstein, J., Muñoz, N., Bosch, F.X., 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 11, 1048–1056. doi:10.1016/S1470-2045(10)70230-8
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 32 Suppl 1, S7–15. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.006
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., Stanley, M.A., 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5, F55–70. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083
- Feller, L., Wood, N.H., Khammissa, R.A.G., Lemmer, J., 2010. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med.* 6, 14. doi:10.1186/1746-160X-6-14
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., Bray, F., 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. URL <http://globocan.iarc.fr> (accessed 7.21.14).
- Geraets, D.T., van Doorn, L.-J., Kleter, B., Colau, B., Harper, D.M., Quint, W.G.V., 2013. Long-term follow-up of HPV16-positive women: persistence of the same genetic variant and low prevalence of variant co-infections. *PloS One* 8, e80382. doi:10.1371/journal.pone.0080382
- Gheit, T., Cornet, I., Clifford, G.M., Iftner, T., Munk, C., Tommasino, M., Kjaer, S.K., 2011. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 20, 1315–1321. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1187
- Godínez, J.M., Heideman, D.A.M., Gheit, T., Alemany, L., Snijders, P.J.F., Tommasino, M., Meijer, C.J.L.M., de Sanjosé, S., Bosch, F.X., Bravo, I.G., 2013. Differential presence of Papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58. *Infect. Genet. Evol.* 13, 96–104. doi:10.1016/j.meegid.2012.09.011
- Grodzki, M., Besson, G., Clavel, C., Arslan, A., Franceschi, S., Birembaut, P., Tommasino, M., Zehbe, I., 2006. Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 15, 820–822. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0864

- Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., de Sanjosé, S., Franceschi, S., Clifford, G.M., 2012. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int. J. Cancer* 131, 2349–2359. doi:10.1002/ijc.27485
- Halfon, P., Benmoura, D., Agostini, A., Khiri, H., Pénaranda, G., Martineau, A., Blanc, B., 2010. Stepwise algorithm combining HPV high-risk DNA-based assays and RNA-based assay for high grade CIN in women with abnormal smears referred to colposcopy. *Cancer Biomark.* 7, 133–139. doi:10.3233/CBM-2010-0156
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41, 95–98.
- Hildesheim, A., Wang, S.S., 2002. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* 89, 229–240.
- Jeronimo, J., Schiffman, M., 2006. Colposcopy at a crossroads. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 349–353. doi:10.1016/j.ajog.2006.01.091
- Kasamatsu, E., Cubilla, A.L., Alemany, L., Chaux, A., Tous, S., Mendoza, L., Paez, M., Klaustermeier, J.E., Quint, W., Lloveras, B., de Sanjose, S., Muñoz, N., Bosch, F.X., 2012. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J. Med. Virol.* 84, 1628–1635. doi:10.1002/jmv.23373
- Kitchener, H.C., Almonte, M., Thomson, C., Wheeler, P., Sargent, A., Stoykova, B., Gilham, C., Baysson, H., Roberts, C., Dowie, R., Desai, M., Mather, J., Bailey, A., Turner, A., Moss, S., Peto, J., 2009. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 10, 672–682. doi:10.1016/S1470-2045(09)70156-1
- Koliopoulos, G., Chrelias, C., Pappas, A., Makridima, S., Kountouris, E., Alepaki, M., Spathis, A., Stathopoulou, V., Panayiotides, I., Panagopoulos, P., Karakitsos, P., Kassanos, D., 2012. The diagnostic accuracy of two methods for E6&7 mRNA detection in women with minor cytological abnormalities. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* doi:10.1111/j.1600-0412.2012.01414.x
- Malagón, T., Drolet, M., Boily, M.-C., Franco, E.L., Jit, M., Brisson, J., Brisson, M., 2012. Cross-protective efficacy of two human papillomavirus vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12, 781–789. doi:10.1016/S1473-3099(12)70187-1
- Markowitz, L.E., Hariri, S., Lin, C., Dunne, E.F., Steinau, M., McQuillan, G., Unger, E.R., 2013. Reduction in Human Papillomavirus (HPV) Prevalence Among Young Women Following HPV Vaccine Introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003–2010. *J. Infect. Dis.* 208, 385–393. doi:10.1093/infdis/jit192

- Martín, P., Kilany, L., García, D., López-García, A.M., Martín-Azaña, M.J., Abaira, V., Bellas, C., 2011. Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infect. Dis.* 11, 316. doi:10.1186/1471-2334-11-316
- Mayrand, M.-H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., Walter, S.D., Hanley, J., Ferenczy, A., Ratnam, S., Coutlée, F., Franco, E.L., 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1579–1588. doi:10.1056/NEJMoa071430
- Mazarico, E., Gonzalez-Bosquet, E., 2012. Prevalence of infection by different genotypes of human papillomavirus in women with cervical pathology. *Gynecol. Oncol.* 125, 181–185. doi:10.1016/j.ygyno.2011.12.450
- Naucler, P., Ryd, W., Törnberg, S., Strand, A., Wadell, G., Elfgrén, K., Rådberg, T., Strander, B., Johansson, B., Forslund, O., Hansson, B.-G., Rylander, E., Dillner, J., 2007. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1589–1597. doi:10.1056/NEJMoa073204
- Ortiz, M., Torres, M., Muñoz, L., Fernández-García, E., Canals, J., Cabornero, A.I., Aguilar, E., Ballesteros, J., Del Amo, J., García-Sáiz, A., 2006. Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1428–1434. doi:10.1128/JCM.44.4.1428-1434.2006
- Ovestad, I.T., Vennestrøm, U., Andersen, L., Gudlaugsson, E., Munk, A.C., Malpica, A., Feng, W., Voorhorst, F., Janssen, E.A.M., Baak, J.P.A., 2011. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUS/LSIL, prediction of CIN2-3 in follow up biopsies and spontaneous regression of CIN2-3. *Gynecol. Oncol.* 123, 278–283. doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.024
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B.K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S., Das, B.C., 2008. Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in north India. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1060–1066. doi:10.1128/JCM.02202-07
- Pérez-Gallego, L., Moreno-Bueno, G., Sarrió, D., Suárez, A., Gamallo, C., Palacios, J., 2001. Human papillomavirus-16 E6 variants in cervical squamous intraepithelial lesions from HIV-negative and HIV-positive women. *Am. J. Clin. Pathol.* 116, 143–148. doi:10.1309/42U5-Q2EV-RCBM-WPGJ
- Pista, A., Oliveira, A., Barateiro, A., Costa, H., Verdasca, N., Paixão, M.T., 2007. Molecular variants of human papillomavirus type 16 and 18 and risk for cervical neoplasia in Portugal. *J. Med. Virol.* 79, 1889–1897. doi:10.1002/jmv.21002

- Porras, C., Rodríguez, A.C., Hildesheim, A., Herrero, R., González, P., Wacholder, S., Burk, R.D., Schiffman, M., 2009. Human papillomavirus types by age in cervical cancer precursors: predominance of human papillomavirus 16 in young women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 18, 863–865. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0951
- Quaas, J., Reich, O., Frey Tirri, B., Koppers, V., 2013. Explanation and Use of the Colposcopy Terminology of the IFCPC (International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy) Rio 2011. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 73, 904–907. doi:10.1055/s-0033-1350824
- Quint, K.D., de Koning, M.N.C., van Doorn, L.-J., Quint, W.G.V., Pirog, E.C., 2010. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 117, 297–301. doi:10.1016/j.ygyno.2010.02.003
- Rijkaart, D.C., Berkhof, J., van Kemenade, F.J., Coupe, V.M.H., Hesselink, A.T., Rozendaal, L., Heideman, D.A.M., Verheijen, R.H., Bulk, S., Verweij, W.M., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2012. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int. J. Cancer* 130, 602–610. doi:10.1002/ijc.26056
- Rose, B.R., Thompson, C.H., Zhang, J., Stoeter, M., Stephen, A., Pfister, H., Tattersall, M.H., Cossart, Y.E., 1997. Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol. Oncol.* 66, 282–289. doi:10.1006/gyno.1997.4740
- Santiago Pérez, M.I., Hervada Vidal, X., Naveira Barbeito, G., Silva, L.C., Fariñas, H., Vázquez, E., Bacallao, J., Mújica, O.J., 2010. The Epidat program. *Rev. Panam. Salud Pública* 27, 80–82.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H.W., Killackey, M., Kulasingam, S.L., Cain, J., Garcia, F.A.R., Moriarty, A.T., Waxman, A.G., Wilbur, D.C., Wentzensen, N., Downs, L.S., Jr, Spitzer, M., Moscicki, A.-B., Franco, E.L., Stoler, M.H., Schiffman, M., Castle, P.E., Myers, E.R., 2012. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 137, 516–542. doi:10.1309/AJCPTGD94EVRJCG
- Schiffman, M., Rodriguez, A.C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M.E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P.E., Burk, R.D., 2010. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral

- persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res.* 70, 3159–3169. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4179
- Schiller, J.T., Castellsagué, X., Garland, S.M., 2012. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine* 30 Suppl 5, F123–138. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.108
- Sellers, JW, 2003. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical. Manual para principiantes. Organización Panamericana de la Salud, EUA.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E.L., Villa, L.L., 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int. J. Cancer* 120, 1763–1768. doi:10.1002/ijc.22481
- Sjoeborg, K.D., Tropé, A., Lie, A.K., Jonassen, C.M., Steinbakk, M., Hansen, M., Jacobsen, M.B., Cuschieri, K., Eskild, A., 2010. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 118, 29–34. doi:10.1016/j.ygyno.2010.03.007
- Smith, B., Chen, Z., Reimers, L., van Doorslaer, K., Schiffman, M., Desalle, R., Herrero, R., Yu, K., Wacholder, S., Wang, T., Burk, R.D., 2011. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS One* 6, e21375. doi:10.1371/journal.pone.0021375
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr, Young, N., 2002. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287, 2114–2119.
- Sørbye, S.W., Arbyn, M., Fismen, S., Gutteberg, T.J., Mortensen, E.S., 2011. Triage of Women with Low-Grade Cervical Lesions - HPV mRNA Testing versus Repeat Cytology. *PLoS ONE* 6, e24083. doi:10.1371/journal.pone.0024083
- Sørbye, S.W., Fismen, S., Gutteberg, T., Mortensen, E.S., 2010. Triage of women with minor cervical lesions: data suggesting a “test and treat” approach for HPV E6/E7 mRNA testing. *PLoS One* 5, e12724. doi:10.1371/journal.pone.0012724
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., Bültmann, B., 2004. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3176–3184. doi:10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004
- Sotlar, K., Stubner, A., Diemer, D., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., Bültmann, B., 2004. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 74, 107–116. doi:10.1002/jmv.20153
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* doi:10.1093/bioinformatics/btu033

- Stoler, M.H., Vichnin, M.D., Ferenczy, A., Ferris, D.G., Perez, G., Paavonen, J., Joura, E.A., Djursing, H., Sigurdsson, K., Jefferson, L., Alvarez, F., Sings, H.L., Lu, S., James, M.K., Saah, A., Haupt, R.M., 2011. The accuracy of colposcopic biopsy: analyses from the placebo arm of the Gardasil clinical trials. *Int. J. Cancer* 128, 1354–1362. doi:10.1002/ijc.25470
- Szarewski, A., Ambroisine, L., Cadman, L., Austin, J., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Dina, R., McCarthy, J., Buckley, H., Bergeron, C., Soutter, P., Lyons, D., Cuzick, J., 2008. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 17, 3033–3042. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0508
- Szarewski, A., Mesher, D., Cadman, L., Austin, J., Ashdown-Barr, L., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Young, M., Stoler, M., McCarthy, J., Wright, C., Bergeron, C., Soutter, W.P., Lyons, D., Cuzick, J., 2012. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1867–1873. doi:10.1128/JCM.00181-12
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Ting, J., Kruzikas, D.T., Smith, J.S., 2010. A global review of age-specific and overall prevalence of cervical lesions. *Int. J. Gynecol. Cancer* 20, 1244–1249.
- Tjalma, W.A., Fiander, A., Reich, O., Powell, N., Nowakowski, A.M., Kirschner, B., Koiss, R., O’Leary, J., Joura, E.A., Rosenlund, M., Colau, B., Schledermann, D., Kukk, K., Damaskou, V., Repanti, M., Vladareanu, R., Kolomiets, L., Savicheva, A., Shipitsyna, E., Ordi, J., Molijn, A., Quint, W., Raillard, A., Rosillon, D., De Souza, S.C., Jenkins, D., Holl, K., 2012. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int. J. Cancer* 132, 854–867. doi:10.1002/ijc.27713
- Tornesello, M.L., Duraturo, M.L., Botti, G., Greggi, S., Piccoli, R., De Palo, G., Montella, M., Buonaguro, L., Buonaguro, F.M., 2006. Prevalence of alpha-papillomavirus genotypes in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive cervical carcinoma in the Italian population. *J. Med. Virol.* 78, 1663–1672. doi:10.1002/jmv.20752
- Tropé, A., Sjøborg, K., Eskild, A., Cuschieri, K., Eriksen, T., Thoresen, S., Steinbakk, M., Laurak, V., Jonassen, C.M., Westerhagen, U., Jacobsen, M.B., Lie, A.K., 2009. Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2458–2464. doi:10.1128/JCM.01863-08

- Villa, L.L., Slichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., Franco, E.L., 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* 81, 2959–2968.
- Wentzensen, N., Schiffman, M., Dunn, T., Zuna, R.E., Gold, M.A., Allen, R.A., Zhang, R., Sherman, M.E., Wacholder, S., Walker, J., Wang, S.S., 2009. Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical cancer early endpoints and determinants. *Int. J. Cancer* 125, 2151–2158. doi:10.1002/ijc.24528
- Wheeler, C.M., Castellsagué, X., Garland, S.M., Szarewski, A., Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Chow, S.-N., Apter, D., Kitchener, H., Teixeira, J.C., Skinner, S.R., Jaisamrarn, U., Limson, G., Romanowski, B., Aoki, F.Y., Schwarz, T.F., Poppe, W.A.J., Bosch, F.X., Harper, D.M., Huh, W., Hardt, K., Zahaf, T., Descamps, D., Struyf, F., Dubin, G., Lehtinen, M., 2012. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol.* 13, 100–110. doi:10.1016/S1470-2045(11)70287-X
- Wheeler, C.M., Yamada, T., Hildesheim, A., Jenison, S.A., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 11–19.
- Xi, L.F., Kiviat, N.B., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Ho, J., Koutsky, L.A., 2006. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1045–1052. doi:10.1093/jnci/djj297
- Xi, L.F., Koutsky, L.A., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Winer, R.L., Ho, J., Kiviat, N.B., 2007. Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16, 4–10. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0670
- Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Greer, C.E., Munoz, N., Bosch, F.X., Wheeler, C.M., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* 71, 2463–2472.
- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M., 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58, 829–833.
- Zuchna, C., Hager, M., Tringler, B., Georgouloupoulos, A., Ciresa-Koenig, A., Volgger, B., Widschwendter, A., Staudach, A., 2010. Diagnostic accuracy of guided cervical biopsies: a prospective multicenter study comparing the histopathology of

simultaneous biopsy and cone specimen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 321.e1–6.
doi:10.1016/j.ajog.2010.05.033

Zuna, R.E., Moore, W.E., Shanesmith, R.P., Dunn, S.T., Wang, S.S., Schiffman, M., Blakey, G.L., Teel, T., 2009. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population. *Int. J. Cancer* 125, 2609–2613.
doi:10.1002/ijc.24706

