

Métodos utilizados en la identificación del virus de papiloma humano***Methods used in the identification of human papillomavirus*****Z. De Guglielmo, A. Rodríguez****RESUMEN**

Dada la relación causal establecida entre tipos específicos de VPH con el cáncer cervical y lesiones precursoras, es importante la identificación del tipo viral involucrado. La tipificación se realiza mediante diversos métodos que varían en sensibilidad y especificidad, cuya utilización depende, principalmente, del objetivo perseguido y de las características de la muestra evaluada. La tipificación del VPH no sólo es importante clínicamente para el seguimiento y establecimiento del tratamiento a un paciente dado; además permite conocer los tipos virales que circulan en una población, lo que es de interés en el desarrollo de programas de prevención y tratamiento de esta enfermedad. Este trabajo es una revisión sobre métodos utilizados en la detección e identificación del VPH en lesiones de cáncer de cuello uterino, resaltando sus características de sensibilidad y especificidad.

Palabras clave. VPH. Cáncer cervical. Tipificación viral.

ABSTRACT

Given the causal relationship between specific types of HPV with cervical cancer and precursor lesions, it is important to identify the viral type involved. The characterization is done by various methods that vary in sensitivity and specificity, whose use depends mainly on the aim pursued and the characteristics of the evaluated sample. HPV typing is not only important clinically for the establishment of monitoring and treatment of a patient, it also provides knowledge of the viral types circulating in a population, which is of interest in the development of prevention and treatment programs for this disease. This paper is a review of methods used in the detection and identification of HPV in cervical cancer lesions, highlighting their sensitivity and specificity.

Key words. HPV. Cervical cancer. Viral typing.

An. Sist. Sanit. Navar. 2010; 33 (1): 71-77

Correspondencia

Zoraya De Guglielmo

Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Oncología y Hematología

Hospital Universitario de Caracas

Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos

Caracas. Venezuela

E-mail: zdegugli@gmail.com

Recepción: 18 de junio de 2009

Aceptación provisional: 27 de octubre de 2009

Aceptación definitiva: 10 de noviembre de 2009

INTRODUCCIÓN

Es bien conocida la relación etiológica entre el VPH y el cáncer cervical, siendo los tipos virales de alto riesgo oncogénico 16 y 18 responsables de aproximadamente el 70% de los casos de cáncer invasivo de cuello uterino y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEag), mientras que los tipos de bajo riesgo 6 y 11 son encontrados con mayor frecuencia en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEbg) y, al menos, en el 90% de papilomas y condilomas^{1,2}. Además de las lesiones de alto y bajo grado, se ha establecido el diagnóstico citológico de «células escamosas atípicas de significado incierto» (ASCUS, de las siglas en inglés), introducido en el sistema de clasificación Bethesda para denominar alteraciones celulares inespecíficas que pudieran o no estar relacionadas con el VPH o, bien, aquellas lesiones «ambiguas» que a pesar de su carácter atípico no pueden ser consideradas como LIEag o LIEbg. Dada la presencia de VPH de alto o bajo riesgo oncogénico en el cáncer cervical y lesiones precursoras, se ha resaltado la importancia de identificar el tipo viral involucrado en una patología, lo cual contribuye a optimizar el diagnóstico y a implementar tratamientos y protocolos de seguimiento más adecuados para pacientes afectados por esta enfermedad. En tal sentido, este trabajo presenta una revisión sobre distintos métodos utilizados en la detección e identificación del VPH en lesiones de cáncer de cuello uterino, resaltando sus características de sensibilidad y especificidad.

DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VPH

Los estudios realizados muestran una gran variabilidad en cuanto a la sensibilidad y especificidad de los distintos métodos utilizados en el cribado del VPH, dependiendo del uso del método en sí, las características de la población/muestra evaluada, el tipo de lesiones y, de gran importancia, la cantidad y calidad del material biológico. La infección causada por este virus puede evidenciarse indirecta-

mente mediante examen citológico o histopatológico a partir de cambios morfológicos sugestivos o directamente mediante pruebas moleculares que, a diferencia de los anteriores, permiten detectar el genoma y/o identificar el tipo viral involucrado. También se utilizan pruebas serológicas basadas en la detección de anticuerpos circulantes y la respuesta inmunitaria al nivel celular inducida por la infección viral, que incluyen el estudio de péptidos de las regiones E2, E4, L1, L2, E6 y E7 de los tipos 16 y 18 de VPH y la detección de anticuerpos frente a proteínas transformantes E6 y E7 expresadas *in vitro* por transcripción y transducción, así como de estructuras proteicas conformacionales de la cápside viral L1 y L2 desprovistas de ADN (*virus like particles*), con las que además se preparan vacunas de tipo preventivo. La sensibilidad de estas pruebas es baja (entre 50-70%), en comparación a la detección de ADN viral mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Sin embargo, la detección de anticuerpos se interpreta como un marcador de exposición persistente al VPH en mujeres normales y está en evaluación como marcador de diseminación metastásica en pacientes con carcinoma invasor³.

En la actualidad la citología cervical es la herramienta más usada para el cribado del cáncer cervical⁴. No obstante, presenta un porcentaje de falsos negativos que, dependiendo del laboratorio, puede alcanzar 20-30% de los frotis examinados⁵. Dentro de las limitaciones de la citología cérvico-vaginal como método convencional para la pesquisa de cáncer cérvico-uterino caben resaltar la dificultad y elevado costo de su automatización para reducir el error humano y la sobrevaloración de los hallazgos citológicos; esto, a su vez, conlleva al diagnóstico de cambios atípicos ambiguos que no pueden ser confirmados, tratamientos excesivos por Papanicolaou dudosos y manejo inadecuado de pacientes con lesiones cervicales cuyo Papanicolaou fue negativo para la infección por VPH y que, sin embargo, pudieran presentar una infección latente que solo se diagnosticaría molecularmente⁶. Entre las alternativas para superar tales limitaciones se ha propuesto

la citología en fase líquida que consiste en la preparación de suspensiones celulares en medio líquido y obtención de láminas monocelulares (limpias de residuo y de grumos celulares), con la lectura computarizada de los frotis^{3,7}.

Dada la relación causal que existe entre tipos específicos de VPH con el cáncer cervical y las lesiones precursoras, distintos estudios han resaltado la importancia de utilizar métodos que permitan la tipificación viral, así como las ventajas de combinar los estudios citológicos con dichos métodos para mejorar el valor predictivo negativo (probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano) de la prueba citológica convencional, permitiendo el incremento en los intervalos de periodicidad para la realización de la misma y la disminución de los costos de programas de salud^{8,9}. Un valor predictivo negativo elevado de la detección viral es muy útil en la práctica ya que, si no se detecta el virus, la posibilidad de que se esconda una lesión de alto grado es muy baja; se ha establecido que la evaluación de VPH de alto riesgo en combinación con una citología vaginal negativa representa un valor predictivo negativo para la progresión de la enfermedad a cáncer cervical mayor a 98%¹⁰. Esto adquiere mayor significación tomando en cuenta que para algunos investigadores resulta controversial la forma de atender a las pacientes con diagnóstico de ASCUS, ya que entre 5-17% de citologías con esta clasificación son posteriormente diagnosticadas como LIEag en la biopsia cervical¹¹, lo cual refleja limitaciones en la reproducibilidad de este diagnóstico. Otros estudios registran un riesgo de 32,5% para el desarrollo de lesiones de alto grado a partir de lesiones ASCUS positivas para VPH tipo 16¹².

Tales observaciones en el diagnóstico ASCUS y las implicaciones clínicas de la infección con VPH de alto riesgo oncogénico (especialmente el tipo 16) ha determinado que investigadores consideren y sugieran la detección directa del VPH en estos casos mediante pruebas moleculares, tomando en cuenta que tal identificación puede ser

importante en la estratificación del riesgo de progresión hacia lesiones más graves, para un monitoreo y seguimiento apropiado de pacientes ASCUS. También se ha propuesto introducir la determinación viral con procedimientos de automuestreo como técnica de cribado primario en países subdesarrollados, donde los programas de citología son deficitarios^{1,13}.

En el caso de la citología se ha reportado un valor promedio de sensibilidad de 61,3% con una dispersión considerable (18,6-94%), lo que resalta la elevada subjetividad de este método y justifica un control estricto de su calidad, así como la necesidad de su repetición frecuente; esta sensibilidad incrementa con la edad de las pacientes (79,3% por encima de los 50 años frente a 55,4% entre los 35-49 años y 48,7% por debajo de los 35 años). En contraste, la RCP presenta una sensibilidad mayor (aproximadamente 90%), con un intervalo más compacto (84,9-100%) que no varía con la edad, así como una homogeneidad de los resultados significativamente superior. En ambos casos la especificidad incrementa con la edad, aunque es más alta en la citología que en la RCP. Se ha sugerido que la baja especificidad de las pruebas basadas en ADN de VPH en mujeres jóvenes se debe a la alta prevalencia de infecciones transitorias en esta población¹⁴⁻¹⁶.

Los métodos moleculares de detección y/o identificación del ADN viral comprenden la ya mencionada RCP (y sus variantes: RCP anidada, RCP múltiple, RCP y estudio de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción o RFLP) que puede combinarse con hibridación o digestión enzimática de los productos de amplificación para la tipificación viral. Los kits comerciales disponibles para tal fin incluyen el ensayo SPF₁₀-INNO LiPA, la captura de híbridos de segunda generación (HC2-Digene/Qiagen), el Invader HPV test de segunda generación (Inv2 Test- Third Wave Technologies, Inc), el método de amplificación AMPLICOR HPV Test y el Roche Linear Array HPV Genotyping Test; los dos últimos, desarrollados por Roche Molecular Systems y aceptados por la FDA para revisión en el 2007, permi-

ten la identificación de 13 genotipos de alto riesgo y 37 genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico, respectivamente¹⁷⁻¹⁹.

El HC2, primer método aceptado y registrado por la FDA para la detección del VPH, es un procedimiento cualitativo que consiste en la hibridación, en formato de microplaca, del ADN liberado de la muestra en estudio con sondas de ARN específicas para la identificación grupal de 13 tipos virales de alto riesgo (16/18/31/33/35/39/45/ 51/52/56/58/59/68) y 5 tipos de bajo riesgo (6/11/42/43/44). Los híbridos ADN:ARN son capturados sobre una superficie que contiene anticuerpos específicos para estos híbridos que, seguidamente, reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfataza alcalina. La unión es detectada por un sustrato quimioluminiscente de dioxetano, produciéndose una señal amplificada por lo menos 3.000 veces que es medida con un luminómetro en unidades relativas de luz (RLU)²⁰.

Esta técnica permite la discriminación entre grupos de VPH, pero no del tipo viral específico, a diferencia de la RCP. Al comparar ambos métodos respecto a la detección de ADN de VPH en mujeres con citologías equívocas o dudosas, se obtuvieron resultados de sensibilidad y especificidad similares: 87,4 y 55,6 % para la RCP con iniciadores genéricos MY11 y MY09, y 92,5 y 51 % para el HC2; los autores de este trabajo explican que el hecho de que en la RCP se usen cantidades relativamente menores de material, respecto a la usada en el HC2, pudo haber limitado su sensibilidad, lo cual resalta la importancia de optimizar y estandarizar los procedimientos basados en RCP para aplicaciones clínicas²¹.

La tecnología Amplicor consiste en la amplificación del ADN blanco por RCP, seguida de hibridación de los ácidos nucleicos para la identificación de 13 genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico en células cervicales recolectadas en un medio de transporte; adicionalmente, evalúa la presencia del gen humano de -globina, como control interno de la amplificación y de calidad de la muestra biológica. Al comparar este método con el HC2 se encontró una

concordancia de aproximadamente 84%, (índice kappa=0,63). Amplicor registró más muestras positivas para VPH de alto riesgo, con una ligera diferencia (7%) respecto al HC2, un hallazgo que debe considerarse cuando la detección directa del VPH es usada en la evaluación de resultados citológicos dudosos²²; esta diferencia pudiera deberse a la mayor sensibilidad que en general presentan los métodos basados en RCP y sugiere un uso clínico óptimo diferente para ambas pruebas que requiere de mayor evaluación²³. También se ha reportado que Amplicor, en combinación con la colposcopia y la citología de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, es una poderosa herramienta predictiva independiente de este tipo de lesiones^{22,24}. Al compararlo con el INNO LiPA, la concordancia fue aún más alta, aproximadamente 98%²⁵.

Las pruebas Linear Array (Roche) e INNO-LiPA consisten en la hibridación reversible de productos de amplificación obtenidos por RCP con iniciadores biotinilados para VPH con sondas específicas inmovilizadas en un sustrato sólido; la hibridación es detectada mediante reacción colorimétrica. Con ambos métodos se amplifica un fragmento de la región L1 del genoma viral, de 450 y 65 pb respectivamente. Al compararlos, se encontró una alta concordancia (índice kappa=0,859), con una compatibilidad de 96,5% en la determinación de genotipos específicos (incluyendo los tipos 16 y 18), aún en presencia de varios tipos de VPH, lo que señala que ambas metodologías son reproducibles, precisas y con utilidad clínica en la detección e identificación confiable de un amplio rango de genotipos de VPH; sin embargo hubo diferencias significativas en la detección de algunos genotipos virales poco frecuentes, como el 42 y el 59²⁶. El Linear Array también fue comparado con la secuenciación del ADN, registrándose una alta concordancia (aproximadamente 92%) que pone en evidencia la elevada exactitud de esta prueba en la tipificación del VPH, la cual se mantiene aún en presencia de infecciones múltiples que no pueden ser resueltas por la secuenciación del ADN²⁷.

El Inv2 Test es un sistema semiautomatizado que detecta 14 tipos de VPH de alto riesgo, representados en 3 sets de sondas (A5/A6 para VPH tipos 51, 56 y 66; A7 para VPH tipos 18, 39, 45, 59 y 68; A9 para VPH tipos 16, 31, 33, 35, 52 y 58), destacando que las sondas para VPH tipos 16 y 18 están en sets diferentes. En comparación al HC2, que solo permite discriminar entre grupos virales de alto y bajo riesgo oncocogénico, el Inv2 Test solo reconoce y discrimina entre grupos de VPH de alto riesgo, haciendo posible la selección de casos que pudieran ser positivos para los tipos 16 y 18, que necesitarían una tipificación posterior. También tiene la ventaja de presentar un control interno para evaluar la calidad de la muestra y de incluir al VPH tipo 66, que fue recientemente introducido en el grupo de VPH de alto riesgo oncocogénico por la Asociación Internacional para la Investigación del Cáncer²⁸. Considerando estas características y el riesgo potencial de lesiones ASCUS portadoras de VPH 16 ó 18, se ha sugerido una aplicación clínica del Inv2 Test en este tipo de lesiones para seleccionar aquellas que ameriten mayor atención²⁹. También se ha señalado que puede ser usado potencialmente como una prueba de primera línea en el cribado rutinario de VPH²⁸.

Al comparar esta prueba con el HC2 en un estudio donde se evaluaron citologías con diagnóstico de ASCUS, se obtuvo una buena correlación (86,8%) en la detección de VPH de alto riesgo oncocogénico²⁹.

Cabe mencionar que Hologic Inc adquirió la empresa Third Wave Technologies Inc y basándose en el Inv Test, desarrolló el Cervista HPV HR Test, recientemente aprobado por la FDA, el cual detecta 14 tipos de VPH de alto riesgo, y el Cervista HPV 16/18, test recomendado para la detección de los tipos 16 y 18 en mujeres mayores de 30 años, en combinación con la citología cervical. Al igual que el Inv2, estos test presentan una especificidad similar a la del HC2 y una sensibilidad superior al 90% en la detección de LIEag; además, eliminan el diagnóstico de falsos negativos debido a que permiten evidenciar si la cantidad de ADN presente en la muestra es adecuada³⁰.

Finalmente, debe señalarse que todos estos métodos están siendo estudiados para su inclusión clínica como procedimientos alternativos en la detección de VPH y, a pesar de los altos costos y los inconvenientes técnicos que pudieran representar al nivel clínico y práctico, es importante considerar las ventajas y beneficios que aportan en el tratamiento de pacientes, la determinación de riesgos e, incluso, la prevención del cáncer cervical, considerando la repercusión que en tal prevención pudiera tener la aplicación de programas de evaluación citológica que faciliten y optimicen la detección y tratamiento de lesiones precancerosas.

En conclusión, la detección y la tipificación del VPH tienen una participación resaltante en la determinación de la progresión de lesiones precursoras del cáncer cervical ya que clínicamente pudieran incrementar la eficacia del seguimiento y tratamiento de pacientes. Particularmente, la identificación de VPH de alto riesgo oncocogénico debería realizarse rutinariamente para la clasificación de pacientes con citologías ASCUS. Asimismo, la tipificación del VPH permite conocer los tipos virales circulantes en una población, facilitando el desarrollo e implementación de programas de prevención y tratamiento de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- DIESTRO TEJEDA MD, SERRANO VELASCO M, GÓMEZ-PASTRANA NIETO F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al VPH. Oncología 2007; 30: 42-59.
- National Cancer Institute. HPV (Human papillomavirus) Vaccines for Cervical Cancer 2007. Disponible on line en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/hpv-vaccines>. Consultada en septiembre 2007.
- BOSCH FX, DE SANJOSÉ S, CASTELLSAGUÉ X. Virus de papiloma humano: riesgo oncocogénico y nuevas oportunidades para la prevención. An Sist Sanit Navar 2001; 24: 7-14.
- CAÑADAS MP, LLOVERAS B, LORINZ A, EJARQUE M, FONT R, BOSCH FX et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. Salud Pública Mex 2006; 48: 373-378.

5. MELO A, ROA I, MONTENEGRO S, CAPURRO I, ROA J. Estudio comparativo de detección del virus papiloma humano (VPH) en muestras citológicas y biopsias de cuello uterino. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 639-644.
6. CORRENTI M, CAVAZZA ME, BAJARES M, BELLO J, CERRUTI R, ACOSTA H et al. Detección de virus papiloma humano (VPH) mediante biología molecular y su asociación con neoplasia cervical uterina. *Rev Venez Oncol* 1997; 9: 76-83.
7. RENSHAW AA, YOUNG NA, BIRDSONG GG, STYER PE, DAVEY D, MODY DR et al. Comparison of performance of conventional and ThinPrep gynecologic preparations in the college of American pathologists gynecologic cytology program. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 128: 17-22.
8. FRANCO EL, ROHAN TE, VILLA LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 506-511.
9. MANOS MM, KINNEY WK, HURLEY LB, SHERMAN ME, SHIEH-NGAI J, KURMAN RJ et al. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 1999; 281: 1605-1610.
10. WHEELER C, HUNT WC, SCHIFFMAN M, CASTLE PE. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis* 2006; 194: 1291-1298.
11. ESKRIDGE C, BEGNEAUD W, LANDWEHR C. Cervicography combined with repeat Papanicolaou test as triage for low grade cytologic abnormalities. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 351-355.
12. CASTLE PE, SOLOMON D, SCHIFFMAN M, WHEELER CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-1071.
13. CAÑADAS MP, LLOVERAS B, LORINCZ A, EJARQUE M, FONT R, BOSCH FX et al. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. *Salud Pública Mex* 2006; 48: 373-378.
14. COX T, CUZICK J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: from evidence to policies. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 8-11.
15. CUZICK J, CLAVEL C, PETRY KU, MEIJER CJ, HOYER H, RATNAM S et al. Overview of the european and north american studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006; 119: 1095-1101.
16. PUIG-TINTORÉ LM. Utilización del test de VPH en el cribado primario del cáncer de cérvix. XVIII Congreso de la AEPCC. Granada 2006.
- Disponible on line en: http://www.aepcc.org/download/congresos/xviii/ponencias/GR_S1-5.pdf Consultada en enero 2008.
17. Roche Molecular Diagnostic. Disponible en: <http://molecular.roche.com> (última consulta 29 de octubre de 2009).
18. Inmunolab. Investigación Biomédica. Disponible en: <http://www.inmunolab.com/> (última consulta 29 de octubre de 2009).
19. Roche. Roche España. Disponible en: <http://www.rochediagnostics.es> (última consulta 29 de octubre de 2009)
20. Qiagen. Ample and Assay Technologies. Disponible en: <http://www1.qiagen.com/Products/digeneHPVTesthc2.aspx#Tabs=t1> (última consulta 29 de octubre de 2009).
21. SCHIFFMAN M, WHEELER CM, DASGUPTA A, SOLOMON D, CASTLE PE. A comparison of a prototype PCR assay and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus DNA in women with equivocal or mildly abnormal papanicolaou smears. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 722-732.
22. DE FRANCESCO MA, GARGIULO F, SCHREIBER C, CIRAVOLO G, SALINARO F, MANCA N. Comparison of the AMPLICOR human papillomavirus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. *J Virol Methods* 2008; 147: 10-17.
23. SANDRI MT, LENTATI P, BENINI E, DELL'ORTO P, ZORZINO L, CAROZZI FM et al. Comparison of the digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2141-2146.
24. MONSOGO J, BOHBOT JM, POLLINI G, KRAWEC C, VINCENT C, MERIGNARGUES I et al. Performance of the Roche AMPLICOR HPV test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 160-168.
25. VAN HAM MA, BAKKERS JM, HARBERS GK, QUINT WG, MASSUGER L, MELCHERS W. Comparison of two commercial assays for detection of HPV in cervical scrape specimens: validation of the Roche Amplicor HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2662-2667.
26. VAN DOORN LJ, QUINT W, KLETER B, MOLIJN A, COLAU B, MARTIN MT et al. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGMY line blot assay and the SPF10 line probe assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 979-983.

27. GIULIANI L, COLETTI A, SYRJÄNEN K, FAVALLI C, CIOTTI M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear array in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res* 2006; 26: 3939-3941.
28. GINOCCHIO CC, BARTH D, ZHANG F. Comparison of the third wave invader Human papillomavirus (HPV) assay and the digene HPV hybrid capture 2 assay for detection of high-risk HPV DNA. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1641-1646.
29. WONG AK, CHAN RC, NICHOLS S, BOSE S. Human papillomavirus (HPV) in atypical squamous cervical cytology: the Inv HPV test as a new screening assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 869-875.
30. SCHIFFMAN M, SOLOMON D. Findings to date from the ASCUS-LSIL triage study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 946-949.

