



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA**  
**SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019”**

**TANIA MABEL ALFONZO SALINAS**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

**Marzo, 2021**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA**  
**SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019”**

**Tutor: Prof. Dra. Laura Patricia Mendoza Torres, MSc, PhD.**

**Co-tutores: Bioq. Pamela Mongelós, MSc.**

**Bioq. Adriana Valenzuela, MSc.**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**San Lorenzo – Paraguay**

**Marzo, 2021**

Alfonzo Salinas, Tania Mabel

Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019 / Tania Mabel Alfonzo Salinas; Tutora: Laura Patricia Mendoza Torres, Co tutoras: Adriana Beatriz Valenzuela Cáceres, Pamela Esther Mongelós Dacunte -- San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

cxii, 112p; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. Infecciones por papillomavirus 2. Papillomavirus humano 16 3. Neoplasias del cuello uterino 4. Anticuerpos antivirales 5. Neoplasia intraepitelial cervical. Título

CDD (ed. 18<sup>a</sup>) 614  
A128d



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**LA PROF. DRA. LAURA PATRICIA MENDOZA TORRES, MSc, PhD, DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.**

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “**Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **TANIA MABEL ALFONZO SALINAS** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 23 días del mes de marzo de 2021.

---

**Tutora: Prof. Dra. Laura Mendoza, MSc, PhD**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**LA BIOQ. ADRIANA BEATRIZ VALENZUELA CÁCERES, MSc y LA B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc, DOCENTES INVESTIGADORAS DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.**

**INFORMAN:** Que el presente documento, titulado “**Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **TANIA MABEL ALFONZO SALINAS** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 23 días del mes de marzo de 2021.

---

**Co-Tutor:**

**Bioq. Adriana Valenzuela, MSc**

---

**Co-Tutor:**

**B.C. Pamela Mongelós, MSc**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



LA B.C. **PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “**Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **TANIA MABEL ALFONZO SALINAS** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección del/la docente investigador(a) **PROF. DRA. LAURA PATRICIA MENDOZA TORRES, MSc, PhD** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 23 días del mes de marzo de 2021.

---

**B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.**  
**Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Título del trabajo de tesis.**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Tania Mabel Alfonzo Salinas

Aprobado el 28 de junio del 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD; Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Prof. Dra. Iara Magaly Martínez Pereira, PhD; Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

Dra. María Liz Bobadilla Frizzola, MSc; Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, Paraguay

Prof. Dr. Gerardo Daniel Deluca, PhD; Universidad Nacional Nordeste, Corrientes, Argentina

---

Prof. Dra. Laura Patricia Mendoza Torres, MSc, PhD

---

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.  
Directora de Postgrado FCQ



*Universidad Nacional de Asunción*  
**RECTORADO**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA  
SALUD  
UNIDAD DE DOCENCIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
Campus de la UNA, San Lorenzo - Paraguay  
postgrado@iics.una.py  
Teléfono: 595 021 326 5411



**ACTA DE EVALUACIÓN**

<b>EVALUACIÓN DE</b>	<b>DEFENSA PÚBLICA DE TESIS</b>
<b>NÚMERO DE CREDITOS</b>	<b>S/N</b>
<b>PROGRAMA</b>	<b>Maestría en Ciencias Biomédicas</b>

<b>TÍTULO DE PROYECTO DE TESIS</b>	Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019
------------------------------------	---

**DICTAMEN:**

<b>APELLIDO Y NOMBRE</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	
	<b>NÚMERO</b>	<b>LETRAS</b>
ALFONZO SALINAS, TANIA MABEL	5	Cinco

<b>ACTA: MCB-089</b>	<b>FECHA: 28 de junio del 2021</b>
----------------------	------------------------------------

<b>PRESIDENTE</b>	
Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, PhD.	
<b>MIEMBROS</b>	
Prof. Dra. Iara Magaly Martínez Pereira, PhD.	
Dra. María Liz Bobadilla Frizzola, MSc.	

<b>OBSERVACIÓN:</b> 1. Participa de esta mesa examinadora el Prof. Dr. Gerardo Daniel Deluca, PhD, como evaluador internacional invitado, de manera remota desde la Universidad Nacional Nordeste, Corrientes, Argentina. El dictamen es consensuado entre los 4 miembros, cuyas sugerencias constan en los baremos adjuntos.
--

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Margarita y Gabriel, por haberme formado como la persona que soy,  
muchos de mis logros se los debo a ustedes.

A toda mi familia por ser lo más valioso que tengo y ser mi fortaleza y pilar para  
llevar a cabo mis sueños y cumplir metas.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme, acompañarme, brindarme fortaleza y perseverancia en todo momento para llegar hasta la meta.

A mis padres, Gabriel y Margarita por el apoyo brindado en todo momento a lo largo de mi formación como profesional. Un agradecimiento muy especial a mi mamá, por su acompañamiento incondicional en todo momento, su ayuda incalculable, y por ser mi ejemplo incansable de perseverancia y constancia.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, a la Facultad de Ciencias Químicas y a todos los docentes que contribuyeron durante toda mi formación académica y más aún durante el postgrado, transmitiéndome todos sus conocimientos y permitiéndome llegar a la meta.

Mi gratitud y cariño de siempre a mi tutora la Dra. Laura Mendoza, y a mis cotutoras la Bioq. Adriana Valenzuela, MSc. y la Bioq. Pamela Mongelós, MSc., por brindarme su valiosa colaboración y orientación en el desarrollo de este trabajo.

Al departamento de Salud Pública del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud- UNA, por haberme abierto las puertas para incursionar en el camino de la investigación científica, desde hace años atrás y permitirme colaborar y aprender con los trabajos del departamento. Agradezco también a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Salud Pública, en especial a la Bioq. Fátima Cardozo, MSc. por sus consejos y ayuda brindada en todo momento.

A todas las instituciones nacionales e internacionales, que permitieron que se lleve a cabo tanto el programa de Maestría, como mi trabajo de tesis.

Finalmente, a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a que lograra cumplir uno de los objetivos que me propuse luego de terminar la carrera. A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

# **DETECCIÓN DE TIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO ONCOGÉNICO (VPH-AR) Y DE ANTICUERPOS CONTRA VPH-16 EN MUJERES VPH-AR POSITIVAS CON Y SIN LESIÓN, ESTAMPA 2014-2019**

**Tania Alfonzo\*, Adriana Valenzuela\*\*, Pamela Mongelos\*\*, Laura Mendoza\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\* Departamento de Salud Pública- Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

## **RESUMEN**

El virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) desempeña un papel fundamental en el desarrollo de Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 2 o más (NIC 2+), siendo VPH 16 el más frecuente. Por ello, el objetivo del presente estudio descriptivo de corte transversal fue determinar la frecuencia de tipos de VPH-AR por PCR-RLB y de anticuerpos contra VPH 16 por inmunocromatografía en muestras de cepillado de cuello uterino y de suero, respectivamente, de 306 mujeres VPH-AR positivas por Captura Híbrida 2 (CH2) con y sin diagnóstico de NIC 2+, ESTAMPA 2014-2019. El VPH 16 fue el tipo más frecuente (15,36% IC<sub>95%</sub> 11,75%-19,83%), seguido del VPH 31 (12,42% IC<sub>95%</sub> 9,18%-16,59%). Se observó un aumento de frecuencia de VPH 16 del 10,87% en mujeres sin NIC 2+ al 40,74% con NIC 2+. Además, se observó un 14,05% (IC<sub>95%</sub> 10,60%-18,39%) de anticuerpos contra VPH 16, sin diferencia significativa en mujeres con o sin NIC 2+ ( $p=0,39$ ). Al mismo tiempo, se observó una mayor frecuencia de mujeres con NIC 2+ que se realizaron el último Pap hace más de 5 años ( $p=0,025$ ), con una carga viral relativa intermedia o mayor ( $p=0,013$ ) e infecciones con tipos de VPH-AR más frecuentes (VPH 16/18,  $p=0,0001$ ; VPH 16/18/45,  $p=0,0008$ ; VPH 16/18/45/33/31/52,  $p=0,00003$ ). Estos datos podrían servir para fortalecer estudios epidemiológicos, campañas de educación, así como, para estudios que analicen diferentes opciones de triage (tipificación, carga viral relativa) contribuyendo al manejo de mujeres VPH-AR positivas identificando al grupo que precisará de un control más cercano para prevenir el desarrollo de lesiones NIC2+.

**Palabras claves:** Tipos de VPH AR, anticuerpos contra VPH 16, mujeres con/sin NIC2+.

# DETECTION OF TYPES OF HUMAN PAPILLOMA VIRUSES OF HIGH ONCOGENIC RISK (HPV-AR) AND ANTIBODIES AGAINST HPV-16 IN HPV-AR POSITIVE WOMEN WITH AND WITHOUT INJURY, STAMP 2014-2019

Tania Alfonzo\*, Adriana Valenzuela\*\*, Pamela Mongelos\*\*, Laura Mendoza\*\*

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\* Departamento de Salud Pública- Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

## ABSTRACT

The oncogenic high-risk human papillomavirus (HR-HPV) plays a fundamental role in the development of grade 2 or higher Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2+), with HPV 16 being the most frequent. Therefore, the objective of this descriptive cross-sectional study was to determine the frequency of HR-HPV types by PCR-RLB and of antibodies against HPV 16 by immunochromatography in cervical brushing and serum samples, respectively, from 306 women HR-HPV positive by Hybrid Capture 2 (CH2) with and without CIN 2+, ESTAMPA 2014-2019. HPV 16 was the most frequent type (15.36% CI<sub>95%</sub> 11.75% -19.83%), followed by HPV 31 (12.42% CI<sub>95%</sub> 9.18% -16.59%). An increase in the frequency of HPV 16 was observed from 10.87% in women without CIN 2+ to 40.74% with CIN 2+. Furthermore, 14.05% (CI<sub>95%</sub> 10.60% -18.39%) of antibodies against HPV 16 were observed, with no significant difference in women with or without CIN 2+ ( $p = 0.39$ ). At the same time, there was a higher frequency of women with CIN 2+ who had her last Pap test more than 5 years ago ( $p = 0.025$ ), with an intermediate or higher relative viral load ( $p = 0.013$ ) and infections with most frequent HR-HPV types (HPV 16/18,  $p = 0.0001$ ; HPV 16/18/45,  $p = 0.0008$ ; HPV 16/18/45/33/31/52,  $p = 0.00003$ ). These data could be used to strengthen epidemiological studies, education campaigns, as well as for studies that analyse different triage options (genotyping, relative viral load) contributing to the management of HR-HPV positive women, identifying the group that will require closer control to prevent the development of CIN2+.

**Keywords:** HR-HPV types, antibodies against HPV 16, women with/without CIN2+.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Generalidades.....	2
1.2.	Estructura viral, genómica y organización.....	2
1.3.	Clasificación viral .....	3
1.4.	Ciclo de vida del VPH .....	5
1.5.	Historia natural de infección por virus de papiloma humano .....	7
1.6.	Lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer .....	7
1.7.	Factores de riesgo y desarrollo de cáncer de cuello uterino .....	8
1.8.	Prevención primaria .....	9
1.9.	Prevención secundaria .....	10
1.10.	Potenciales biomarcadores .....	13
1.11.	Epidemiología .....	15
1.12.	Situación en Paraguay .....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	Objetivo general.....	18
2.2.	Objetivos específicos .....	18
3.	METODOLOGÍA .....	19
3.1.	Diseño del estudio.....	20
3.2.	Técnicas moleculares utilizadas.....	22
a)	Detección de infección por VPH-AR en muestras cervicales por la técnica de Captura Híbrida 2 (CH2).....	22
b)	Extracción de ADN de muestras cervicales .....	23
c)	Tipificación de VPH en muestras de cuello uterino por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguida de Hibridación Reversa en Línea (RLB).....	24
d)	Detección de anticuerpos contra VPH 16 por inmunocromatografía.....	25
3.3.	Asuntos éticos .....	26
3.4.	Asuntos estadísticos .....	26
3.4.1	Cálculo del tamaño de la muestra.....	26
3.4.2	Gestión y análisis de los datos .....	26
4.	RESULTADOS .....	28
4.1.	Caracterización de la población VPH positiva .....	29

4.2.	Frecuencia de tipos de VPH.....	31
4.3.	Frecuencia de tipos de VPH de mujeres según diagnóstico anatomopatológico	34
4.4.	Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16.....	38
4.5.	Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16 según diagnóstico anatomopatológico .....	38
4.6.	Frecuencia de características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos según diagnóstico anatomopatológico .....	39
5	DISCUSIÓN.....	41
6	CONCLUSIONES .....	50
7	PERSPECTIVAS .....	53
8	BIBLIOGRAFÍA.....	55
9	ANEXOS.....	71
9.1.	Datos sociodemográficos .....	72
9.2.	Cuestionario Factores de riesgo .....	74
9.3.	Formulario de cepillado endocervical ESTAMPA .....	77
9.4.	Formulario de Colposcopia ESTAMPA .....	78
9.5.	Resultado y diagnóstico de biopsia ESTAMPA .....	79
9.6.	Carta de consentimiento informado .....	80
9.7.	Manual de operaciones .....	89
9.8.	Informe de aceptación de protocolo.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Árbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de la proteína L1 de los VPH. ....	4
<b>Figura 3.1:</b> Mapa del departamento Central incluyendo los sitios del estudio.....	21
<b>Figura 3.2:</b> Flujograma del estudio.....	22
<b>Figura 4.1:</b> Tipificación del VPH por PCR PGMY09/11biot seguida de hibridación reversa (RLB).....	32

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 4.1.</b> Características socio-demográficas y hábito de fumar de 306 mujeres incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, periodo 2014-2019 .....	29
<b>Tabla 4.2.</b> Antecedentes ginecológicos, clínicos y características socio-culturales de 306 mujeres incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019. ....	30
<b>Tabla 4.3.</b> Frecuencia de los tipos de VPH de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019 .....	33
<b>Tabla 4.4.</b> Frecuencia de infecciones simples y múltiples según lesiones de bajo y alto grado de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019.....	34
<b>Tabla 4.5.</b> Frecuencia de los tipos de VPH de mujeres con lesiones de bajo grado con infecciones simples o múltiples, incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019.....	35
<b>Tabla 4.6.</b> Frecuencia de los tipos de VPH de mujeres con lesiones de alto grado con infecciones simples o múltiples, incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019.....	36
<b>Tabla 4.7.</b> Frecuencia de anticuerpos contra el VPH 16 de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019 .....	38
<b>Tabla 4.8.</b> Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16 según lesiones de bajo y alto grado los tipos en 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019.....	38
<b>Tabla 4.9.</b> Frecuencia de características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos según diagnóstico anatomopatológico .....	39

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASCUS</b>	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
<b>CCU</b>	Cáncer de cuello uterino
<b>CH 2</b>	Captura Híbrida 2
<b>ESTAMPA</b>	Estudio de tamizaje y triage de cáncer de cuello uterino con pruebas de virus de papiloma humano
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>LCR</b>	del inglés
<b>LIEAG</b>	Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado
<b>LIEBG</b>	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>NIC 1 o menor</b>	Neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 o menor
<b>NIC 2+</b>	Neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 o mayor
<b>ORF</b>	del inglés Open Reading Frame
<b>Pap</b>	Papanicolaou
<b>PCR</b>	del inglés Polymerase Chain Reaction
<b>PCR-RLB</b>	del inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguida de Hibridación Reversa en Línea (RLB).
<b>RFLP</b>	del inglés Polimorfismo de fragmentos de ADN obtenidos por Enzimas de Restricción
<b>URL</b>	Unidades relativas de luz
<b>URR</b>	del inglés upstream regulatory region
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano
<b>VPH-AR</b>	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico
<b>VPH-BR</b>	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico

## **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Generalidades**

El virus de papiloma humano (VPH) forma parte de una familia heterogénea de virus, que alberga importantes tipos carcinogénicos (1). Los primeros VPH encontrados eran causantes de las verrugas en la piel de varios mamíferos (2), además el aislamiento del mismo en los casos de cáncer de cuello uterino (CCU), anogenital y oral condujo a la expansión del estudio de estos virus en los últimos años, tanto a nivel de la estructura, ciclo viral, etc. Así como posibles pruebas para la detección del virus sobre todo en etapas tempranas, y el desarrollo de vacunas contra el mismo (3).

## **1.2. Estructura viral, genómica y organización**

El VPH está formado por una cápside icosaédrica, sin envoltura y un genoma de ADN circular de doble hélice, con aproximadamente 8000 pares de base que codifica para 8 marcos de lectura abierta (Open Reading Frame- ORFs) (4).

Su genoma se encuentra dividido en tres regiones:

La región regulatoria de corriente arriba URR (upstream regulatory region): no codificadora, que posee secuencias que controlan la transcripción y replicación viral o también llamada unidad larga de control (LCR);

La región temprana E (early): que contiene 6 ORFs, que codifican para las proteínas correspondientes a E1, E2, E4, E5, E6 y E7, las cuales están involucradas en múltiples funciones como la activación de la transcripción, transformación, replicación y la adaptación viral a diferentes ambientes celulares. Las proteínas que intervienen en la replicación viral son la E1 y E2, su control E1 y E4, y las que intervienen en los procesos de transformación celular correspondientes a E5, E6, E7 (5-7).

La región tardía L (late): que contiene a dos ORFs que son L1 y L2, que codifican proteínas de la cápside viral, que forman la estructura del virión y facilitan el empaquetamiento del ADN (1,8). La región L1 codifica la proteína principal de la cápside (región altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH) y la región L2 para proteínas secundarias antígeno-específicas (5,9). Los genes de expresión temprana (E) a diferencia de L1 difieren en su secuencia entre los diferentes tipos de VPH (9).

### **1.3. Clasificación viral**

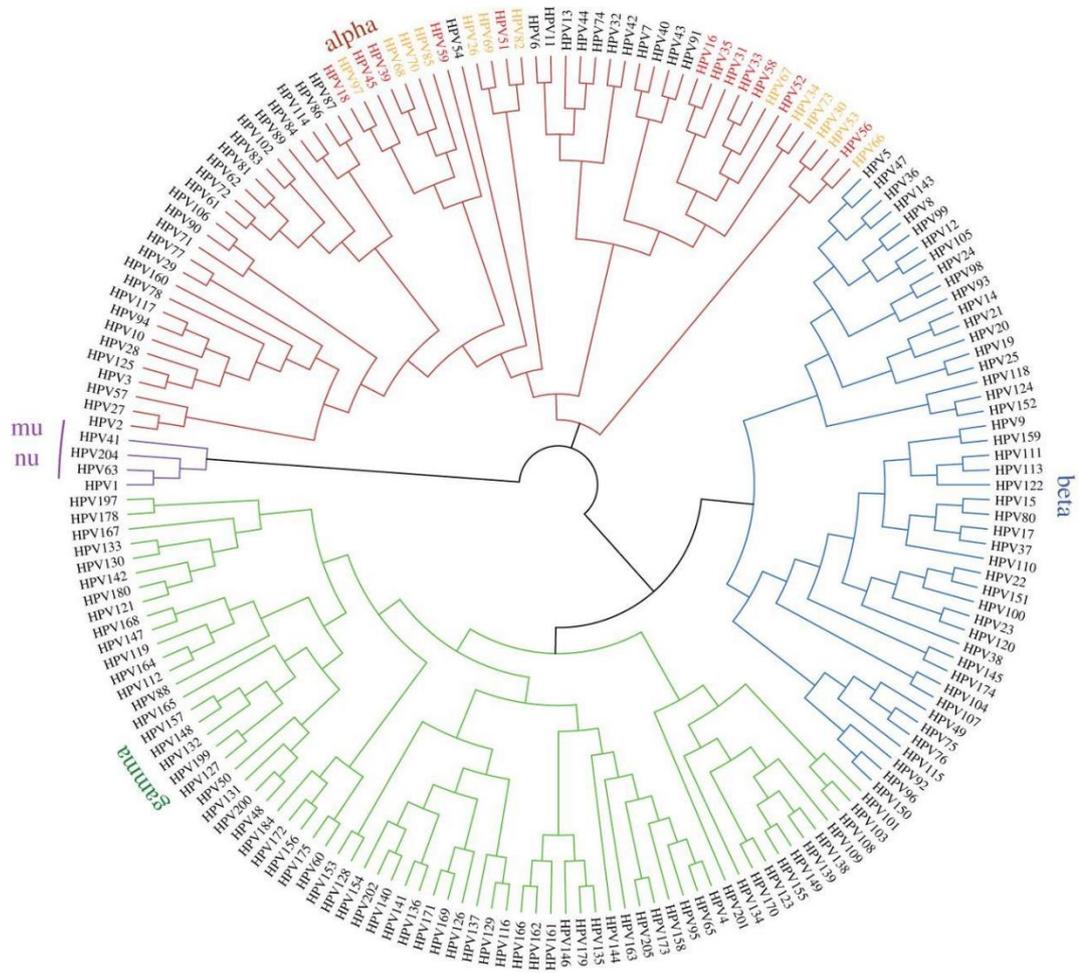
El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Actualmente se conocen más de 200 tipos de VPH clasificados dentro de 29 géneros, aislados de humanos (120 tipos), mamíferos no humanos, aves y reptiles (64, 3 y 2 tipos, respectivamente)(6,7,10).

Las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares, por lo que, se clasifican según la homología de la secuencia de nucleótidos del gen L1 en: género, especie, tipo, subtipo y variantes. Se habla de “género” de VPH, cuando existe menos de un 60% de homología, en cuanto a “especie” se refiere a la asociación filogenética de múltiples tipos de VPH con 60 a 70 % de semejanza en la secuencia génica del gen L1 (11).

Tradicionalmente se han denominado como "tipos", siendo un tipo un genoma de VPH de longitud completa clonado, donde la secuencia de nucleótidos que codifica para L1 es al menos en un 10% diferente de cualquier otro tipo de VPH (6). Los “subtipos” presentan diferencias en la secuencia del gen L1 entre el 2 % al 10 % y las “variantes” difieren en menos del 2% (11).

Los diferentes tipos de VPH se encuentran divididos principalmente en 5 de los 29 géneros (*Alfapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus* (6). Además, se han dividido en tipos mucosos y cutáneos según el tropismo tisular epitelial primario que presenten, así el género alfa contiene a los virus asociados con el desarrollo de tumores de los epitelios mucosos (11).

Los VPH mucoso-trópicos, incluyendo a los que infectan el tracto genital, pueden dividirse a la vez en VPH de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y VPH de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR) dependiendo de su asociación con lesiones malignas o benignas respectivamente (11,12). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) recientemente ha publicado que los VPH-AR se pueden dividir a su vez en aquellos con suficiente evidencia de relación causal con el desarrollo de CCU, incluyendo los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59; y aquellos con limitada evidencia, incluidos los tipos 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82 (13). Por otro lado, los VPH-BR incluyen a VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (12).



**Figura 1.1:** Árbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de la proteína L1 de los VPH. Se muestran 3 géneros de Papilomavirus presentes en humanos (*Alfapapilomavirus*, *Betapapilomavirus*, *Gamapapilomavirus*). El género alfa contiene a los virus asociados con el desarrollo de tumores de los epitelios mucosos (extraído de Alison A. et al. 2017)(14).

#### 1.4. Ciclo de vida del VPH

Los VPH infectan células epiteliales y su ciclo de replicación está íntimamente ligado a la diferenciación epitelial. Los diferentes tipos de VPH identificados hasta la fecha, muestran una especificidad de tejido estricta para la infección (15). La infección por VPH puede producir una variedad de lesiones benignas, por ejemplo, verrugas en los pies, también son comunes en las manos o verrugas genitales. Existe evidencia que sugiere que el ciclo se inicia con lesiones previas o micro heridas en la mucosa del epitelio escamoso que exponen la membrana basal y la capa de células basales a la infección por el virus, el cual posteriormente interacciona con receptores superficiales como heparán sulfato proteoglicanos y posiblemente también laminina (16) presentes en las células epiteliales. Una vez que el virus ingresa la infección es seguida por una fase inicial de amplificación del genoma y luego por el mantenimiento del episoma viral en un bajo número de copias. En la primera fase de la infección solo se expresan las proteínas E1 y E2 que son las responsables de mantener el bajo número de copias. A medida que las células epiteliales infectadas ascienden a la capa suprabasal, se inicia la fase de diferenciación, se estimula la replicación y expresión viral, con un aumento del número de copias virales a miles de copias por célula, y aumenta la expresión de las oncoproteínas tempranas E6 y E7, estas oncoproteínas tempranas inhiben a sus supresores del ciclo celular, las proteínas p53 y Retinoblastoma (pRb) respectivamente, con lo cual reactivan la división celular y mantiene el episoma viral, inhibe la apoptosis y anula la diferenciación epitelial (17). Esto facilita una expansión en el tamaño de la lesión, que se cree que en parte se debe vincular a funciones específicas de las proteínas E6 y E7 de alto riesgo. Existen diferencias funcionales entre las proteínas E7 de alto y bajo riesgo que en gran medida tiene que ver con su capacidad de asociarse con miembros de la familia de la proteína Retinoblastoma (pRb). La proteína E7 de alto riesgo puede unirse y degradar tanto p105 como p107, que controlan la entrada del ciclo celular en la capa basal, así como p130, que participa en la reentrada del ciclo celular en las capas epiteliales superiores (18,19). Por otro lado las proteínas E6 de alto riesgo pueden interactuar con varios blancos, muchos de los cuales están involucrados en la regulación de la polaridad, proliferación y señalización celular (20). Otra característica de las proteínas E6 de alto riesgo es su capacidad para mediar en la degradación de p53 dependiente del proteosoma mediante su ubiquitinación (21,22). La proteína E7 promueve la progresión de la fase S en células diferenciadas, mientras que la proteína E6 está involucrada en la prevención de la

apoptosis, que puede ser inducida en respuesta a esta (23).

En un epitelio no infectado, las células basales migran a las capas celulares suprabasales saliendo del ciclo celular a fin de lograr una diferenciación completa, permitiendo que la superficie epitelial forme una barrera física contra el medio ambiente (24). Durante la infección con tipos de VPH-AR, se piensa que las proteínas E7 y E6 se expresan en las células basales, participando en la proliferación de células basales y parabasales (18,19).

Finalmente, las proteínas de la capsida del virus L1 y L2 se expresan y forman la cápside icosaédrica en donde se empaqueta el genoma del virus recién sintetizado. Para la liberación de los nuevos viriones dependen de la ruptura mecánica de las células infectadas, ya que los VPH no presentan una fase lítica (4,25)

Un subconjunto de los VPH que infectan las mucosas, los llamados VPH de "alto riesgo" (AR), causan enfermedad cervical, categorizada como de grado bajo o alto. La mayoría de las personas experimentarán una infección transitoria por VPH-AR durante su vida, pero estas infecciones no progresarán a una enfermedad o CCU clínicamente significativo porque el sistema inmunológico finalmente reconoce y elimina el virus. La progresión del cáncer se debe a una infección persistente con un VPH-AR (15,26). La infección por VPH-AR es la causa de más del 99,7% de cánceres de cuello uterino en mujeres y un subconjunto de cánceres de orofaringe, predominantemente en hombres. El VPH16 (genotipo 16 del VPH-AR) es el más prevalente en todo el mundo y la principal causa de cánceres asociados al VPH. A nivel molecular, la progresión del cáncer se debe al aumento de la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, que activan el ciclo celular, inhiben la apoptosis y permiten la acumulación de daño en el ADN (25).

## **1.5. Historia natural de infección por virus de papiloma humano**

La mayoría de las mujeres presentan alguna infección por el VPH a lo largo de su vida, sin embargo, solo en un pequeño porcentaje de estas mujeres ocurre la progresión a cáncer, el resto elimina la infección en uno a dos años. Ese pequeño porcentaje de mujeres que no eliminan la infección son las que poseen mayor riesgo de desarrollar cáncer, teniendo en cuenta varios factores como la infección persistente por el VPH-AR, una carga viral alta, mayor proporción del estado integrado del virus, entre otros factores que se asocian con el desarrollo de cáncer invasivo (27–29).

Para que se produzca la transmisión e infección por el VPH debe haber contacto piel a piel, piel a mucosa o mucosa a mucosa. La probabilidad de infección durante el acto sexual es alta (30,31). Debido a que la ruta de transmisión es común entre los tipos de VPH, estos tienden a transmitirse juntos (32,33), resultando en una alta proporción de infecciones concurrentes con varios tipos diferentes(34), lo que implica que durante el acto sexual se podría transmitir varios tipos a la vez. La relación sexual penetrante no es estrictamente necesario para la transmisión y los tipos de VPH pueden al parecer transferirse al cuello uterino desde el introito vaginal (35).

Casi todas las infecciones son transitorias, ya que son controladas por la respuesta inmune. Por otro lado, si la infección por un mismo tipo de VPH no es resuelta en un periodo de 1 a 2 años se considera como persistencia viral. Cerca del 10% de las infecciones por VPH persisten y son las que tienen mayor potencial oncogénico, disminuyendo la probabilidad de que una lesión sea aclarada espontáneamente y aumentando la posibilidad de una lesión o de CCU (36,37).

## **1.6. Lesiones escamosas intraepiteliales y cáncer**

Los hallazgos citológicos de las alteraciones celulares que causa el VPH, se denominan lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) y se clasifican como lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) o bajo grado (LIEBG). LIEBG se refiere generalmente a una infección de VPH transitoria, mientras que LIEAG está asociado frecuentemente a persistencia viral y mayor riesgo de progresión de lesiones de alto grado y cáncer (38). Por otro lado, los hallazgos histológicos reciben la denominación de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y se clasifican en tres niveles progresivos de displasia NIC 1: leve, NIC 2: moderada y NIC 3: severa (39).

La categoría LIEBG corresponde a infecciones víricas, generalmente auto limitadas y que sólo excepcionalmente evolucionan a carcinoma, en tanto que las LIEAG equivalen a verdaderos cambios pre-malignos que se corresponden con NIC 2 o displasia moderada y NIC 3 o carcinoma in-situ (40,41). Por tanto, las lesiones de NIC 2+ incluyen; NIC 2, NIC 3 y CCU.

En las LIEBG se pueden ver implicados tipos muy heterogéneos de VPH de alto y bajo riesgo oncogénico, en tanto que en las LIEAG se hallan más frecuentemente tipos VPH-AR (42). Además, se habla de atíпия de significado indeterminado (ASC-US) para referirse a alteraciones indeterminadas que no permiten descartar totalmente la presencia de una lesión intraepitelial pero tampoco son suficientes para diagnosticarla.

### **1.7. Factores de riesgo y desarrollo de cáncer de cuello uterino**

Se ha demostrado la relación causal entre la infección por el VPH para el desarrollo del CCU (2) donde la infección con tipos de VPH oncogénicos y la persistencia de los mismos, juegan un rol importante, ya que conducen con el tiempo a lesiones de NIC2+.

Además de la infección por un tipo de VPH oncogénico y la persistencia viral, como principales, existen otros factores considerados de riesgo tanto para la adquisición infecciones por VPH como para el desarrollo de lesiones de alto grado y CCU.

Debido a que la infección por el VPH se transmite sexualmente, factores como la edad en la primera relación sexual, el número de parejas sexuales y el comportamiento sexual de la pareja, se asocian con un mayor riesgo de adquisición de la infección (43,44).

En cuanto a la edad temprana en la primera relación sexual, ha sido postulada como un factor de riesgo para la positividad del VPH. Sin embargo, no parece estar independientemente asociada con la positividad del VPH (45), sino que es más probable que sea un predictor del número de parejas sexuales de por vida, ya que cuanto más temprano una mujer inicia sus relaciones sexuales, es más probable que tenga más parejas (30).

Otro factor involucrado sería la alta paridad, a mayor paridad mayor es el riesgo de desarrollar CCU, en cada embarazo la zona de transformación queda expuesta aumentando así la exposición al VPH, también puede deberse a factores hormonales durante el embarazo (46,47).

La probabilidad de desarrollar CCU se duplica en mujeres que usan anticonceptivos hormonales por 10 o más años en comparación a mujeres que no lo utilizan. Probablemente los estrógenos o progestágenos aumentan la expresión génica del VPH en cuello uterino a través de receptores de progesterona, y elementos de respuesta a hormonas en el genoma viral (48). Algunos hábitos como el tabaquismo producen probablemente una disminución de la respuesta inmune en el cuello uterino y epitelio anal, debido a que el tabaco puede afectar al metabolismo de las hormonas femeninas o bien producir un daño directo, ya que el mismo tiene un efecto carcinogénico (47)

Otras infecciones de transmisión sexual como las infecciones por el virus de *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2), *Chlamydia trachomatis* (CT) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) predisponen al desarrollo de cáncer. La infección por HSV-2 y *Chlamydia trachomatis* generan una respuesta inflamatoria que se asocia a la liberación de radicales libres produciendo daño oxidativo al ADN, como la ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las 2 hebras, modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina) y la formación de uniones cruzadas (cross-links) ADN-ADN o ADN-proteína a través de diferentes mecanismos. Por otro lado, la infección por HIV está relacionada con un estado de inmunosupresión, lo cual también predispone al desarrollo de cáncer (49).

### **1.8. Prevención primaria**

Actualmente, se encuentran disponibles 3 vacunas de VPH (bivalente, tetravalente y nonavalente), las cuales han demostrado ser altamente eficaces en la prevención de infecciones persistentes y lesiones asociadas a VPH 16/18 (50–53). Ambos tipos virales causan conjuntamente entre el 70 y el 75% de todos los cánceres de cuello uterino y 40-60% de sus precursores(54–56). En los últimos años, también se ha autorizado una vacuna novalente que protege contra siete tipos de VPH cancerígenos que, en conjunto, causan aproximadamente el 90% de los cánceres de cuello uterino (57,58). Sin embargo, el impacto de las vacunas en la reducción de CCU se verá luego de varias décadas (59). Es importante mencionar que la vacuna tetravalente, fue introducida en Paraguay a partir del año 2013, fue implementada en niñas de 10 años, siendo actualmente vacunadas niñas de 9 a 14 años (60).

## **1.9. Prevención secundaria**

Existen varios métodos sugestivos de presencia de lesión de cuello uterino entre ellos la citología convencional, la citología de base líquida, y las pruebas moleculares basadas en detección de ADN viral, ARN y oncoproteínas, entre otros (61,62).

### **Citología (Papanicolaou- Pap)**

Consiste en una prueba microscópica para poder observar así la arquitectura citológica en busca de células precancerosas o cancerosas que presentan características anómalas, las mismas pueden ser observadas al microscopio de muestras de células tomadas por raspado de la región externa del cérvix, sometiéndoles a tinción con sucesivos colorantes (hematoxilina, ácido hidrociorhídrico, Naranja G y EA50) (63,64). Cuando sus resultados son positivos o anormales, las mujeres son derivadas a colposcopia para evaluar la existencia de lesiones pre-neoplásicas o CCU.

La sensibilidad del Pap varía entre el 30% a 75% aproximadamente en la detección de NIC 2+ y la especificidad promedio es del 97% (61).

También se ha implementado la citología de base líquida que usa los mismos principios y criterios del Pap y está remplazando al Pap convencional en los países desarrollados, esta técnica ha mejorado la eficiencia en el procesamiento de las muestras, pero por otro lado no ha demostrado ser más sensible que la citología convencional (61,65).

### **Colposcopia**

Se basa en un examen visual de la vagina y el cérvix, empleando un colposcopio que permite ver la coloración, angioarquitectura y la existencia de lesiones del cérvix con aumento. Normalmente se lleva a cabo cuando los resultados de la citología u otra prueba utilizada en el tamizaje indican son positivos. En esta técnica se pueden aplicar diversas soluciones, como la de ácido acético al 3 o 5%, para facilitar la identificación de anomalías y permitir si es necesario tomar una biopsia (66).

## **Pruebas moleculares para detección de VPH**

Varios estudios han demostrado a nivel mundial que las pruebas de VPH presentan una elevada sensibilidad y son altamente reproducibles (67–72). Estas pruebas son consideradas para reemplazar la citología cervical como tamizaje primario debido a su alta sensibilidad para detectar lesiones precursoras de CCU y su capacidad para detectar mejor la enfermedad en etapas tempranas, además de su alto valor predictivo negativo que permite prolongar el intervalo de tamizaje en mujeres que no presentan un riesgo mayor de desarrollar CCU, compensando de esta forma, con ahorros, los elevados costos de estas pruebas.

Las pruebas para detección del ADN de VPH con aplicación para el tamizaje generalmente incluyen la detección del ADN de 13 VPH-AR que se encuentran en más del 95% de casos de CCU, entre ellas se encuentran pruebas de amplificación como COBAS AMPLICOR y la Captura Híbrida 2 (CH2), que detecta VPH-AR por la detección directa del genoma por captura de híbridos. Todas estas pruebas poseen una alta sensibilidad pero un bajo valor predictivo positivo, por ello son utilizadas como pruebas de tamizaje (73,74). En el caso de la CH2, si bien esta prueba permite detectar la presencia de ADN viral de los VPH-AR, no brinda información acerca de los tipos virales específicos presentes, ya que debido a su utilidad clínica solo discrimina entre la presencia de infección por VPH-AR o no. Por otro lado con fines epidemiológicos, generalmente se utilizan otras técnicas de tipificación como la PCR en tiempo real y la PCR seguida de hibridación reversa, las que se encuentran entre las más comúnmente utilizadas (75). Recientemente también se han desarrollado pruebas que detectan la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 de algunos VPH-AR, que demostraron ser un marcador altamente sensible y específico para la detección de LIEAG (76,77).

A continuación, se detallan los métodos de CH2 y la PCR seguida de hibridación reversa.

## **Método de CH 2**

Es un ensayo de hibridación en solución del ADN de interés a sondas de ARN mediante amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca. El híbrido ARN-ADN que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA por quimioluminiscencia. Esta técnica permite la detección en forma rápida del ADN viral de 13 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), con una sensibilidad de 1 pg de ADN de VPH 16 clonado por ml de muestra, lo que equivale a 100000 copias por ml de muestra o 5000 copias por ensayo. Además, proporciona valores de carga viral relativa, sin embargo, no determina el tipo viral presente (78–80).

Fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA), EEUU en 2003 para el esclarecimiento de citologías ambiguas con presencia de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), y para el tamizaje, junto con la citología en mujeres a partir de los 30 años. La CH2 también tiene aplicación en el control post-tratamiento de lesiones NIC 2+ graves (81). Posee un valor clínico que se ha demostrado por medio de varios estudios de cohorte, aleatorios y controlados, que incluyeron a cientos de miles de mujeres en todo el mundo (46,67,82) . Por lo tanto, las nuevas pruebas de VPH no necesitan ser evaluadas en ensayos clínicos específicos, sino que deben mostrar que poseen características clínicas equivalentes, no inferiores, a la CH2, antes de ser usadas como tamizaje (46).

Esta prueba presenta ventajas como la alta sensibilidad y el alto valor predictivo negativo. Debido a esto, una paciente con una citología negativa y una determinación de VPH negativa tiene una probabilidad prácticamente nula de tener alguna lesión al menos durante los 5 años siguientes. Como desventajas se citan su especificidad limitada, debido a que la mayoría de las infecciones no se asocian con lesiones y que puede presentar reacciones cruzadas con sondas correspondientes a tipos de VPH de bajo riesgo (83), que ya se ha reportado en varios estudios como el de Preisler et al 2016 (84) donde se encontró que los genotipos 53, 66 y 70 de bajo riesgo presentan mayor frecuencia de reacciones cruzadas (85,86), y la probabilidad de estas aumentó en infecciones múltiples de bajo riesgo (85).

## **Técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se han ensayado diferentes tipos de PCR para detectar ADN de VPH. PCR de amplio espectro: donde se emplean oligonucleótidos consenso que pueden ser utilizados para amplificar un amplio espectro de VPH. PCR específicas de tipo: utilizan cebadores específicos diseñados para amplificar de forma exclusiva un tipo de VPH. Una técnica comúnmente utilizada para la detección de ADN de VPH, donde se utiliza pares de primers PGMY09/PGMY11, que tienen como blanco de amplificación un fragmento de aproximadamente 450 pb dentro del gen L1 de los VPH, que se trata de una región conservada. Generalmente la técnica de PCR que amplifica regiones de L1 asociada a técnicas de hibridación, secuenciamiento o polimorfismo de fragmentos de ADN obtenidos por Enzimas de Restricción (RFLP), permiten realizar la tipificación específica de aproximadamente 40 tipos de VPH (87,88).

### **1.10. Potenciales biomarcadores**

Uno de los principales temas por resolver es cómo identificar, para su posterior evaluación y tratamiento, aquellas mujeres con un resultado VPH positivo que presentan una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad significativa que requiera tratamiento (triage).

Actualmente, como triage existen biomarcadores moleculares como la genotipificación del VPH, oncoproteínas virales E6 y E7, que son los principales efectores de la actividad oncogénica del VPH, la p16<sup>Ink4a</sup>, un inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina sobreexpresado en tejido cervical canceroso y precanceroso, entre otros (89–93)

También se están evaluando el potencial para mejorar la precisión de las pruebas y la clasificación, con diferentes combinaciones de tipos de VPH, y junto con la carga viral, según estudios previos, son predictores importantes de NIC 2+ (94,95).

El VPH 16 es el tipo más frecuente en mujeres paraguayas con y sin lesión, siendo VPH 16 y 18, detectado en 65% y 9% de los casos de CCU (96–98). El riesgo de pre-cancer en mujeres positivas para VPH 16 y 18 sin realizarse una citología convencional, sobrepasa a aquellas de mujeres con diagnóstico citológico anormal de ASCUS (99,100). Wu et al., 2017 observó que para mujeres VPH-AR positivas el triage con VPH 16 y 18 tiene una alta sensibilidad (78,6%) y especificidad (96,8%), comparado con citología como triage (93). En EEUU, se recomienda realizar la detección de VPH 16 y 18 para mujeres VPH positivas con citología normal, y si es positiva se deriva a colposcopia (101).

Entre otras potenciales pruebas se encuentra la detección de anticuerpos contra los tipos virales más frecuentes en CCU (36). Si bien la medición de la respuesta inmune humoral a los antígenos del VPH es fundamental para determinar la eficacia de la vacunación en los países y regiones donde fue implementada (37), la serología del VPH también ha resultado en una herramienta epidemiológica importante para análisis de infecciones pasadas y presentes, el papel de los anticuerpos como utilidad clínica aún, no se encuentra bien definido, algunos estudios están orientados a investigación como potenciales biomarcadores para la detección temprana de las lesiones intraepiteliales (38). El estudio realizado por Chay et al. 2013, mostró una mayor frecuencia de anticuerpos VPH 16 en mujeres que presentaron lesiones de NIC 2+ (odd ratio 2.87 [1.43-5.78], P=.002) (39) sugiriendo que podría ser utilizado para identificar mujeres con mayor riesgo de poseer una lesión cervical (39). Otro estudio realizado por Ewaisha et al. 2017, mostro de igual forma, una mayor frecuencia de anticuerpos contra las diferentes proteínas del VPH detectados en los casos de LIEAG y CCU (38).

Sin embargo, otros estudios reportan que los niveles de anticuerpos, específicamente contra VPH 16, constituyen un mal predictor para la presencia de NIC 3 (40) o que no se correlacionan con la progresión de lesiones, ya que difieren poco entre el CCU y las etapas de NIC (41).

### **1.11. Epidemiología**

El CCU es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres en el mundo, con aproximadamente 593.000 nuevos casos y 330.000 muertes registradas en el 2020, según el último informe de la GLOBOCAN, donde las tasas de incidencia y mortalidad para América del sur fueron de 29,5 y 15,4 por cada 100.000 mujeres respectivamente. Paraguay se encuentra entre los países de la región con mayor incidencia de casos de CCU por año, con una tasa de incidencia de 34,1 y una tasa de mortalidad de 19 por cada 100.000 mujeres, ocupando el segundo lugar en cánceres más incidentes en mujeres paraguayas y actualmente el primer lugar en mortalidad por cáncer en mujeres en nuestro país (102).

### **1.12. Situación en Paraguay**

En Paraguay existen estudios de tipificación de VPH en cuello uterino de mujeres con y sin lesión y de diferentes etnias (97,98,103). Así en un estudio realizado en 502 mujeres que acudieron a centros de salud, el VPH 16 fue el tipo más frecuentemente detectado en mujeres con y sin lesión de cuello uterino (97). Al mismo tiempo, un estudio realizado en la población de 181 mujeres indígenas reportó un 23% de frecuencia de infección por el VPH (incluyendo de AR y BR)(98,104). En adición, en un estudio incluyendo 495 mujeres que acudieron al servicio de patología cervical del sistema de salud pública se observó una alta frecuencia de infección por VPH-AR (14,5%), coincidiendo además que el tipo más frecuente fue el VPH-16 (2,1%), seguido del VPH 31, 33, 58 y 66; en mujeres con citología normal (105). Otro estudio realizado por Kasamatsu et al. 2012 en una población de 432 mujeres con CCU también reportó al VPH-16 como el más frecuente con un 65% de frecuencia (96).

El presente trabajo forma parte del Estudio de Tamizaje y Triage de CCU con pruebas de Virus de Papiloma Humano (ESTAMPA) iniciado en el año 2014, en el cual se realizó la detección del ADN viral por la prueba de CH2, como método de tamizaje primario de CCU en 5770 mujeres de 30 a 64 años provenientes de territorios sociales censados, de San Lorenzo e Itauguá. En dicho estudio se detectó un 14% de positividad de VPH-AR por la técnica de CH2 (786/5670 mujeres) (106).

Actualmente, se sigue con la fase de reclutamiento de las mujeres para el tamizaje con la prueba de VPH. Todas las mujeres VPH positivas fueron orientadas a un estudio colposcópico, donde a las mujeres con impresión colposcópica anormal se les realizó las biopsias para detección de lesiones de cuello uterino por estudio anatómico-patológico. Sin embargo, aún se desconocen los tipos virales específicos presentes en dicha población de mujeres positivas para el VPH-AR.

El presente estudio busca fortalecer el conocimiento sobre los tipos de VPH detectados en muestras de cuello uterino de mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión del estudio ESTAMPA, así como brindar datos sobre la seroprevalencia de VPH-16, incluyendo a diferencia de los estudios citados anteriormente realizados en Paraguay a mujeres provenientes de territorios sociales censados, como San Lorenzo e Itauguá.

Los datos obtenidos en el presente estudio servirán de base para fortalecer el conocimiento epidemiológico, para el desarrollo de nuevas estrategias de prevención del CCU además de proporcionar datos que ayuden a evaluar el potencial impacto de la vacuna de VPH en nuestro país.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1.Objetivo general**

Determinar la frecuencia de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019.

## **2.2.Objetivos específicos**

- Detectar la frecuencia de tipos de VPH en muestras de mujeres positivas para VPH-AR oncogénico del estudio ESTAMPA por PCR RLB.
- Determinar las frecuencias de infección por tipos de según presencia de lesiones de alto grado/cáncer.
- Detectar la presencia de anticuerpos contra VPH-16 en muestras de suero de mujeres VPH-AR positivas, por inmunocromatografía.
- Determinar las frecuencias de anticuerpos contra VPH-16 según presencia de lesiones de alto grado/cáncer.
- Describir características clínicas, demográficas, socioculturales y ginecológicas de mujeres VPH-AR positivas según presencia de lesión de alto grado/cáncer.

### **3. METODOLOGÍA**

### **3.1. Diseño del estudio**

El presente trabajo se desarrolló en el marco del estudio de Estudio de Tamizaje y Triage de CCU con pruebas de Virus de Papiloma Humano (ESTAMPA), aceptado por el Comité Científico y Comité de Ética del IICS, UNA, con código P25/2012.

La población de estudio consistió en mujeres de 30 a 64 años positivas para VPH-AR durante la fase inicial de tamizaje para CCU del estudio ESTAMPA. A continuación, se detalla brevemente los antecedentes del estudio ESTAMPA. En primer lugar, se realizó un censo de territorios sociales de San Lorenzo e Itaugua a fin de identificar mujeres potencialmente elegibles, de 30 a 64 años, quienes fueron invitadas vía telefónica/mensajes/vecinas/amigas a acudir a la Unidad de Salud Familiar (USF) o puestos de salud más cercanos para realizarse los estudios. Se incluyeron en el estudio 4120 mujeres sin historia de CCU, tratamiento para pre-CCU en los últimos 6 meses o histerectomía y sin planes de mudarse fuera del área de estudio, quienes acudieron a los puestos de salud mencionados de las ciudades de Itaugua y San Lorenzo. Datos de características sociodemográficas, antecedentes ginecológicos, clínicos y características socio-culturales fueron registrados en la visita inicial. Se adjunta modelo de consentimiento informado (Anexo 9.6), formulario de datos socio-demográficos (Anexo 9.1) y formulario de factores de riesgo (Anexo 9.2). En la visita inicial a cada mujer se le tomó un cepillado de cuello uterino del cual se realizó un frotis en lámina para el estudio de citología convencional y posteriormente el cepillo fue colocado en una solución de transporte (perservcyt, HOLOGIC, USA) utilizado para realizar la detección de VPH-AR por CH2.

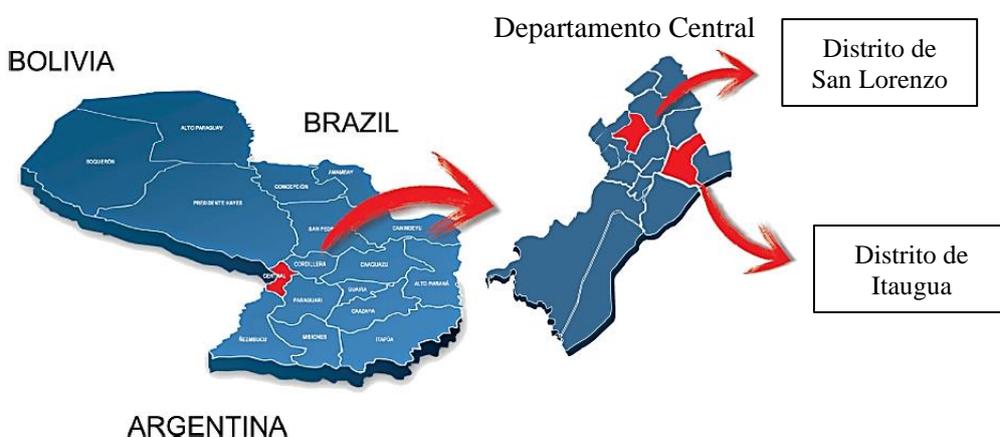
Todas las muestras fueron transportadas al IICS, UNA, en donde posteriormente fueron debidamente alicuotadas y conservadas a -80 °C formando parte de un biobanco. La interpretación de los hallazgos de citología convencional fue realizada por una Anatómo Patóloga, por la técnica de Papanicolaou siguiendo las especificaciones de Solomon et al., 2002 (38).

Las mujeres VPH-AR positivas o con Pap anormal fueron llamadas y agendadas para su visita de colposcopia. Además, fueron tomadas muestras de biopsias en el caso de impresiones colposcópicas anormales. Los resultados de anatomía patológica se clasificaron según Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST) en negativo para lesión escamosa intraepitelial (NSIL), neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC 1 y/o VPH), NIC 2, NIC 3 (carcinoma in situ)

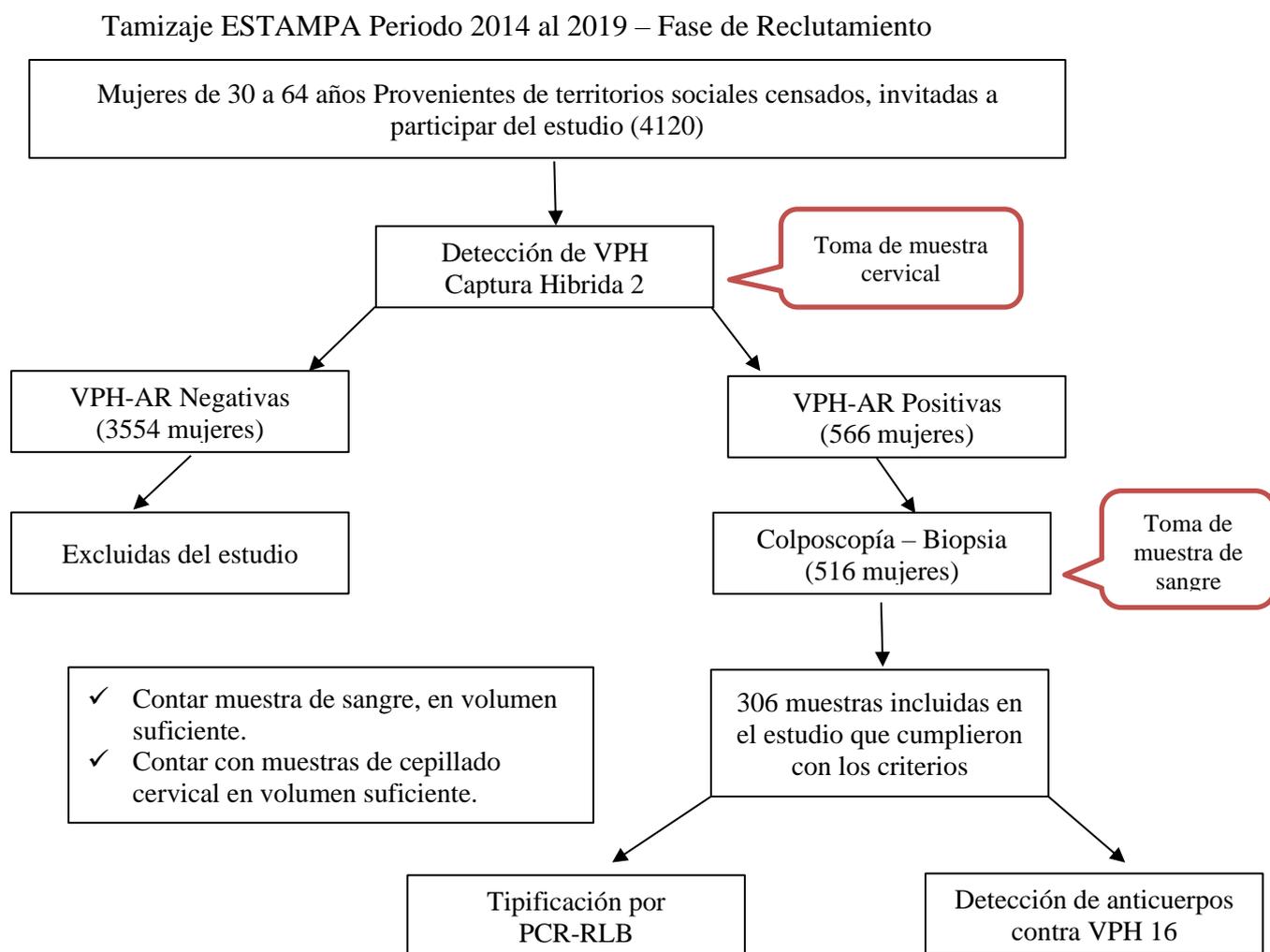
y CCU (107). Mujeres con diagnóstico histológico de NIC 2+ fueron tratadas y enviadas al control rutinario. Mujeres con diagnóstico normal o de NIC 1 fueron enviadas a las visitas colposcópica y la orientación de tratamientos, así como de seguimientos. Al mismo tiempo, durante la visita de colposcopia fueron tomadas con consentimiento de la mujer muestras de sangre que fueron transportadas al IICS, UNA, y conservadas en forma de suero, plasma y capa leucocitaria para detección de potenciales biomarcadores.

Finalmente, en el presente estudio fueron incluidas 306 mujeres positivas para VPH-AR con y sin lesión que tuvieron muestras de volumen suficiente de cepillado de cuello uterino para realizar la tipificación de VPH por PCR-RB y de suero para realizar la detección de anticuerpos contra VPH 16. En la figura 3.1 y 3.2 puede visualizarse el mapa del departamento Central incluyendo los sitios del estudio (a) y el flujograma del estudio (b).

**(a) Figura 3.1: Mapa del departamento Central incluyendo los sitios del estudio**



**(b) Figura 3.2: Flujograma del estudio**



**Figura 3.1. Mapa del Dpto. Central incluyendo los sitios del estudio** (Extraída de Kasamatsu et al. 2019) (a) y el flujograma del estudio (b).

**3.2. Técnicas moleculares utilizadas**

**a) Detección de infección por VPH-AR en muestras cervicales por la técnica de Captura Híbrida 2 (CH2)**

Las muestras de cepillado endocervical (Cervex, Hologic, USA) de mujeres que formaron parte del estudio ESTAMPA, fueron recolectadas en la primera visita de reclutamiento para la detección de VPH-AR. Una vez tomada la muestra el cepillo fue introducido en un tubo colector

(preservcyt, Hologic, USA). Estas fueron transportadas al IICS y mantenidas a temperatura ambiente (15-30°C) hasta su procesamiento.

En el marco del proyecto ESTAMPA, se realizó la detección cualitativa del ADN viral de 13 tipos de VPH-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, siguiendo las instrucciones detalladas en el kit (Prueba Qiagen ® HC2 HPV DNA).

Esta técnica tiene como fundamento la hibridación de las sondas de ARN de los 13 tipos de VPH-AR y el ADN de simple hebra desnaturalizado previamente presente en las muestras cervicales. La señal de luminiscencia producida por la reacción fue expresada como unidades relativas de luz (URL), proporcional a la cantidad de ADN blanco presente en la muestra. Los controles positivos y negativos proveídos por Qiagen fueron utilizados por triplicado (108). Se consideró un resultado positivo con  $URL/CO \geq 1$ .

En el presente estudio, todos los resultados positivos para VPH-AR de mujeres que asistieron a su visita de colposcopia y contaron con suficiente muestra de cepillado de cuello uterino y de sangre fueron incluidas para el análisis posterior de tipificación por PCR seguida de hibridación reversa en línea.

#### **b) Extracción de ADN de muestras cervicales**

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras cervicales VPH-AR positivas por CH2 colectadas al inicio, en el reclutamiento, utilizando el kit de extracción (PureLink, Genomic DNA Mini Kit, marca Invitrogen, USA).

**c) Tipificación de VPH en muestras de cuello uterino por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) seguida de Hibridación Reversa en Línea (RLB).**

Todas las muestras positivas para VPH-AR por CH2 fueron tipificadas por la técnica de PCR-RLB. A fin de determinar los tipos virales presentes y así poder obtener las frecuencias de infección de los tipos virales.

Para la tipificación de VPH, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 450 pb dentro del gen L1 de los VPH, utilizando los primers genéricos PGMY09 y PGMY11biot el cual se encuentra biotinilado en el extremo 5' y luego se realizó una reacción de hibridación reversa en línea (RLB), el ensayo permitió la tipificación de 43 muestras por vez, utilizando oligosondas específicas que permiten la identificación de 33 tipos de VPH según las instrucciones de la primera edición (2009) del manual de laboratorio del papiloma virus humano redactado por la Organización Mundial de la Salud (Human Papillomavirus Laboratory Manual, WHO HPV LabNet, First Edition 2009) (109).

**PCR (Primers PGMY09/11biot)**

El sistema de PCR de primers PGMY09/11biot amplifica los tipos de VPH pertenecientes al grupo de mucosos. Además, este sistema incluye primers para un blanco celular, el antígeno leucocitario humano (HLA), produciendo un amplicón de 230 pb, que es utilizado como un control interno de la reacción, de esa manera su presencia nos permite saber que el ADN ha sido extraído en cantidades suficientes y que los inhibidores no impiden la amplificación (109).

Brevemente, el volumen final fue de 50uL conteniendo; 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.025 unidades/ul de Taq DNA polimerasa, 80nM del mix de primers PGMY09, 80nm del mix de primers PGMY11biot y 5 ul de ADN extraído. La amplificación del DNA se realizó en un termociclador incluyendo un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 9 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 1min 30s y 72 °C por 2min y una extensión final de 72 °C por 5 min. (109)

Los productos de amplificación fueron almacenados en un freezer a -20°C hasta la tipificación por RLB.

### **Hibridación reversa en línea (RLB)**

Los productos de la PCR PGMY09/11biot, fueron sometidos a una desnaturalización por calor en un tampón con bajo contenido de sal, posteriormente los amplicones de VPH biotinilados fueron hibridados con una matriz paralela de sondas específicas de tipo de VPH, covalentemente unidas a membrana de nylon con carga negativa. Estas sondas son sintetizadas con un grupo C6 amino terminal en 5' con el fin de poder unirse covalentemente a la membrana. Después del lavado, los híbridos fueron revelados por quimioluminiscencia en una película de autorradiografía. Este ensayo permitió la tipificación de hasta 43 muestras por vez, pudiendo identificarse 33 tipos diferentes de VPH, (Incluidos VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57b, 58, 59a, 59b, 66, 68, 69, 70, 73, 82, 83, y 84) esto es debido a la utilización de oligosondas tipo-específicas (156).

#### **d) Detección de anticuerpos contra VPH 16 por inmunocromatografía**

La detección de anticuerpos contra VPH-16 en muestras de suero, se realizó utilizando el test PT Monitor de prueba rápida para la detección cuantitativa de anticuerpos de suero humano contra VPH-16 L1, siguiendo las indicaciones detalladas en el kit (Abviris GmbH)(34).

El mismo detecta anticuerpos dirigidos contra la proteína L1 de la capsida del VPH-16. Para la expresión del resultado del ensayo, la línea obtenida en el campo de reacción se midió fotométricamente mediante un lector y se correlacionó con la concentración de anticuerpos contenida en la muestra por medio de datos de calibración específica, curva de calibración, de cada lote. Finalmente, el resultado se expresó en unidades de ng/ml. Se determinó como punto de corte de presencia de anticuerpos contra VPH 16 al valor de 500 ng/ml, por encima del cual la muestra es positiva para anticuerpos contra VPH 16. Dicho valor ya fue establecido de fabrica (34).

### **3.3. Asuntos éticos**

En el marco del proyecto ESTAMPA, en la primera visita (tamizaje) de las mujeres, previo a la toma de muestra, las participantes fueron informadas detalladamente acerca del estudio, firmaron un consentimiento informado (Anexo 8.6), aprobado bajo el código P25/2012 por el Comité de Ética y Comité Científico del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA). Los objetivos del estudio, así como los beneficios y riesgos fueron explicados a las mujeres participantes incluidas, previo a la firma del consentimiento informado (ver Anexo 9.6). Todos los datos colectados fueron codificados y almacenados en una computadora, con acceso solo a los investigadores asegurando así la confidencialidad.

La detección de tipos de VPH por PCR-RLB y de anticuerpos contra VPH-16 fueron estudios posteriores que se realizaron en mujeres que aceptaron con la firma del consentimiento informado que sus muestras fueran sometidas a otros estudios, aclarando que todos los estudios realizados posteriormente no tendrán influencia en su manejo clínico, pero si contribuirán a buscar mejores estrategias para fortalecer la prevención de CCU.

### **3.4. Asuntos estadísticos**

#### **3.4.1 Cálculo del tamaño de la muestra**

El tamaño de muestra se calculó en base a la menor frecuencia de infecciones por VPH-16 del 18% que fue observada en mujeres positivas para VPH-AR con y sin lesión de cuello uterino, provenientes del estudio realizado por Bobadilla et. al 2019 (105).

Teniendo en cuenta una amplitud de 0,15 y un intervalo de confianza del 95%, el tamaño de muestra mínimo requerido fue de al menos 101 mujeres positivas para VPH de alto riesgo (HULLEY et al., 2007).

#### **3.4.2 Gestión y análisis de los datos**

El análisis de los datos se realizó empleando procedimientos de estadística descriptiva y analítica utilizando el programa (CDC, Atlanta) Epi Info TM 7.2.2.6.

Para determinar la frecuencia de los tipos de VPH en la población se tuvo en cuenta tanto las infecciones simples y múltiples. Para estimar la posible asociación entre los antecedentes ginecológicos y socioculturales con la presencia de anticuerpos contra VPH 16 y tipos de VPH presentes, fue utilizado el test de Chi cuadrado, considerándose estadísticamente significativo los valores de  $p < 0,05$ .

A fin de determinar las frecuencias y analizar las características socio-demográficas y los antecedentes ginecológicos y clínicos con la presencia de lesiones de alto grado y cáncer, las siguientes variables cuantitativas (edad, edad de inicio de relaciones sexuales y número de parejas sexuales, número de embarazos y carga viral relativa) fueron convertidas a variables dicotómicas, según los valores de mediana observados en la población de estudio. Por tanto, el punto de corte utilizado para la edad fue de 41 años, para edad inicio de relaciones sexuales fue de 18 años, para el número de parejas sexuales fue de 3 parejas, número de embarazos también fue de 3, y el número de años previos que no se realizaron el Pap fue de 5 años.

Con respecto a la carga viral relativa se estableció como carga viral relativa baja aquellos valores menores a 10 URL y como carga viral relativa intermedia o alta aquellos valores de 10 o mayor URL, siguiendo las indicaciones de Lorincz et al 2002 (108).

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1. Caracterización de la población VPH positiva

De las 306 mujeres positivas para VPH-AR la mediana de edad fue de 41 años (IC<sub>25%-75%</sub> 35-49 años), siendo el rango etario mayoritario (52,29%) el comprendido entre los 30 a 41 años. El 98,04% de las mujeres refirió saber leer y escribir, sin embargo, solo el 22,5% manifestó tener un nivel terciario o más, además la mayoría de las mujeres (85,95%) manifestó no haber consumido cigarrillos (Tabla 4.1).

<b>Tabla 4.1. Características socio-demográficas y hábito de fumar de 306 mujeres incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, periodo 2014-2019</b>				
<b>Edad</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango Intercuartílico</b>		
	41	35	49	
<b>Rangos de edad</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>30 a 41</b>	160	52,29%	46,70%	57,82%
<b>42 a 54</b>	111	36,27%	31,09%	41,80%
<b>55 a 67</b>	35	11,44%	8,34%	15,49%
<b>Lee</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>SI</b>	300	98,04%	95,79%	99,10%
<b>NO</b>	6	1,96%	0,90%	4,21%
<b>Escribe</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>SI</b>	300	98,04%	95,79%	99,10%
<b>NO</b>	6	1,96%	0,90%	4,21%
<b>Nivel de escolaridad</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>No asistió a la escuela</b>	4	1,31%	0,51%	3,31%
<b>Primaria</b>	125	40,85%	35,49%	46,44%
<b>Secundaria</b>	107	34,97%	29,84%	40,47%
<b>Terciaria o más</b>	69	22,55%	18,22%	27,56%
<b>NS/NR</b>	1	0,33%	0,06%	1,83%
<b>Consumo de cigarrillos (años)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>0</b>	263	85,95%	81,61%	89,40%
<b>&lt;10</b>	20	6,54%	4,27%	9,88%
<b>≥10</b>	21	6,86%	4,53%	10,26%
<b>NS/NR</b>	2	0,65%	0,18%	2,35%

ESTAMPA: Estudio Multicéntrico de Tamizaje y Triage de CCU con Pruebas de Virus de Papiloma Humano.  
NS: No sabe; NR: no responde

En cuanto a los antecedentes ginecológico, clínicos y socioculturales, se observó que la mediana de edad de la primera relación sexual fue de 18 años (IC<sub>25%-75%</sub> 16-20 años), así también, se observó que el 55,23% inició sus relaciones sexuales a una edad igual o mayor a los 18 años. Se evidenció que la mediana del número de parejas sexuales durante toda la vida fue de 3 (IC<sub>25%-75%</sub> 1-4) y que el 48,04% de las mujeres manifestó haber tenido 3 o más parejas sexuales en toda su vida. Cabe resaltar que, el 60,46 % nunca utilizó preservativo con su pareja y el 63,40% tuvo igual a 3 o más embarazos durante su vida (3, IC<sub>25%-75%</sub> 2-5). Además, el 21,84% declaró no haberse realizado un estudio de Pap en un periodo de tiempo mayor a 5 años previos al presente estudio, el 91,83% manifestó no tener antecedentes de alguna infección y un alto porcentaje (89,5%) declaró siempre presentar buenas conductas de higiene posterior al acto sexual (Tabla 4.2).

<b>Tabla 4.2. Antecedentes ginecológicos, clínicos y características socio-culturales de 306 mujeres incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019.</b>				
<b>Edad de la primera relación sexual (años)</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango Intercuartílico</b>		
	18	16	20	
<b>Rangos de edad (años)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<18	137	44,77%	39,30%	50,37%
≥18	169	55,23%	49,63%	60,70%
<b>N° de parejas sexuales durante todo su vida</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango Intercuartílico</b>		
	3	1	4	
<b>N° de parejas sexuales durante todo su vida</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<3	143	46,73%	41,22%	52,33%
≥3	147	48,04%	42,50%	53,63%
NS/NR	16	5,23%	3,24%	8,32%
<b>N° de embarazos</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango Intercuartílico</b>		
	3	2	5	
<b>N° de embarazos</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
0	20	6,54%	4,27%	9,88%
<3	92	30,07%	25,20%	35,42%
≥3	194	63,40%	57,87%	68,60%
<b>Uso del preservativo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
SI	121	39,54%	34,23%	45,12%
NO	185	60,46%	54,88%	65,77%
<b>Antecedente de infección</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
Ninguna	281	91,83%	88,22%	94,41%
Sífilis	7	2,29%	1,11%	4,65%
Herpes	5	1,63%	0,70%	3,77%
VPH	3	0,98%	0,33%	2,84%

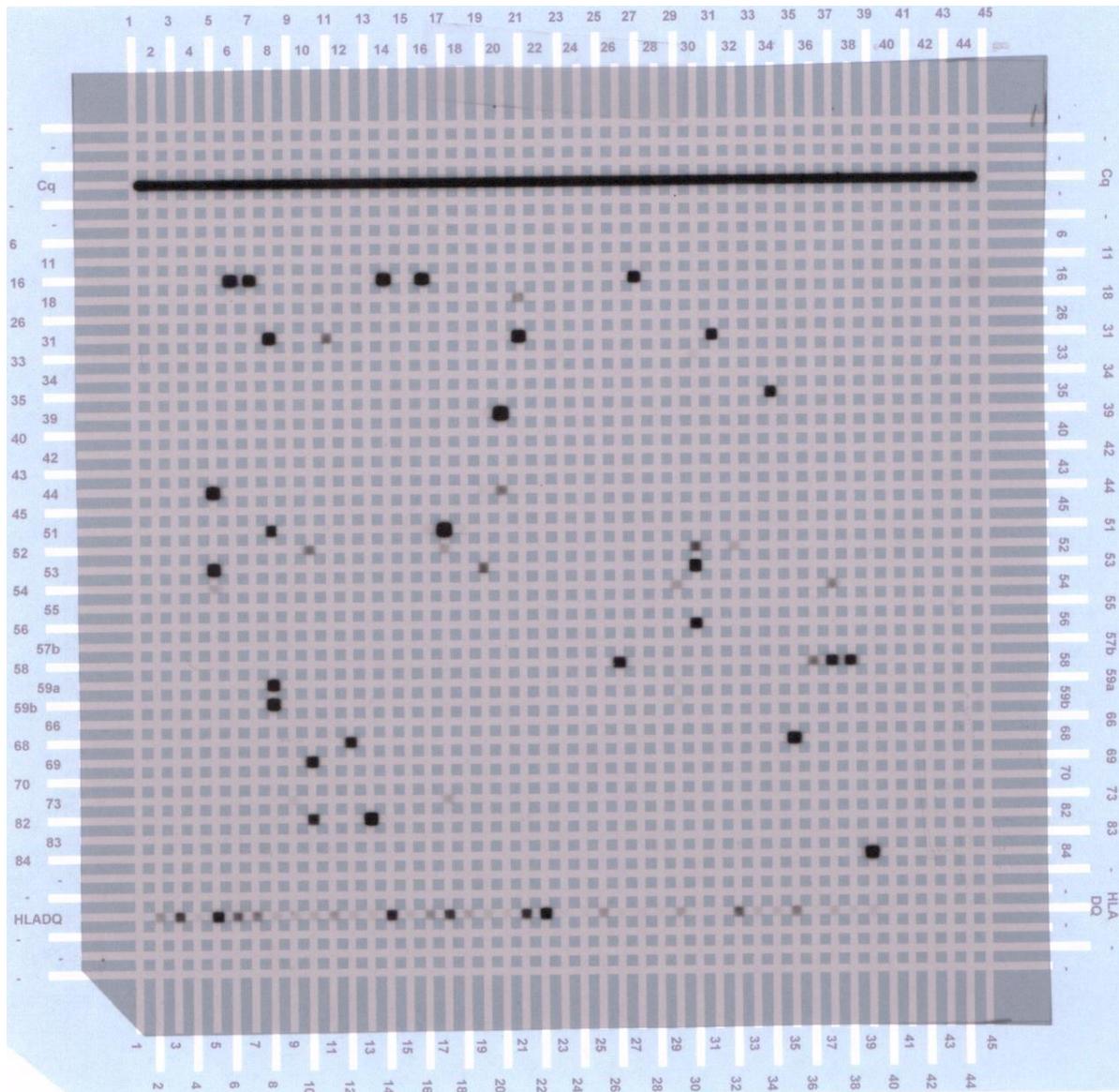
<b>Otro</b>	5	1,63%	0,70%	3,77%
<b>NS/NR</b>	5	1,63%	0,70%	3,77%
<b>Higiene posterior al coito</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>Siempre</b>	273	89,51%	85,56%	92,47%
<b>Casi siempre</b>	19	6,23%	4,02%	9,52%
<b>A veces</b>	8	2,62%	1,33%	5,09%
<b>Rara vez</b>	4	1,31%	0,51%	3,32%
<b>NS/NR</b>	1	0,33%	0,06%	1,83%
<b>Previo Pap (años)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>&lt;2</b>	155	52,90%	47,01%	58,73%
<b>2 a 5</b>	74	25,26%	20,38%	30,64%
<b>&gt;5</b>	64	21,84%	17,25%	27,02%

ESTAMPA: Estudio Multicéntrico de Tamizaje y Triage de CCU con Pruebas de Virus de Papiloma Humano.  
NS: No sabe; NR: no responde

En relación al diagnóstico anatomopatológico, del total de 306 mujeres incluidas en el estudio; 230 mujeres obtuvieron resultados negativos para lesión escamosa intraepitelial (75,17% IC<sub>95%</sub> 69,75%-81,20%), 32 mujeres diagnóstico de NIC 1 (10,46% IC<sub>95%</sub> 7,51-14,39), 5 mujeres diagnóstico de NIC 2 (1,63 IC<sub>95%</sub> 0,70-3,77), 34 mujeres diagnóstico de NIC 3 (11,11% IC<sub>95%</sub> 7,84-16,59) y 5 mujeres diagnóstico de CCU (1,63% IC<sub>95%</sub> 0,70-3,77).

#### 4.2. Frecuencia de tipos de VPH

Las 306 muestras de cepillado de cuello uterino incluidas en el estudio por PCR RLB presentaron resultados positivos para al menos un tipo de VPH. En la figura se observan los resultados de la tipificación de 38 muestras cervicales recolectadas durante la 1° visita (tamizaje) de mujeres participantes del proyecto ESTAMPA.



**Figura 4.1:** Tipificación del VPH por PCR PGMY09/11biot seguida de hibridación reversa (RLB). En las columnas 1, 42 y 45 no se sembraron muestras, las muestras sembradas en las columnas 2 al 4, 15, 18, 23 al 25, 28, 33 y 40 fueron indeterminadas para VPH, que posteriormente fueron centrifugadas y procesadas de vuelta hasta obtener el tipo viral o el control. Las muestras sembradas en las columnas 5 al 14, 16 al 17, 19 al 21, 26 al 27, 29 al 32 y 34 al 39 fueron positivas para algunos de los 33 tipos de VPH detectables por esta técnica. Este sistema incluye, además, el antígeno leucocitario humano (HLA), que sirve como control, ya que nos permite saber si el ADN ha sido extraído en cantidades suficientes y si los inhibidores no impiden la amplificación y por último incluye un control del revelado (Cq).

El tipo más frecuente detectado en las 306 mujeres fue el VPH 16 en 47/306 mujeres 15,36% (IC<sub>95%</sub> 11,75%-19,83%). En 38/306 mujeres 12,42% (IC<sub>95%</sub> 9,18%-16,59%) se observó infección por el VPH 31, y en 36/306 mujeres, 11,76% (IC<sub>95%</sub> 8,62%-15,86%) de las mismas presentaron infección por el VPH 59, entre los tipos más frecuentes. Las frecuencias de los demás tipos de VPH-AR detectados se pueden observar en la tabla 4.3. Además, por reacción cruzada fueron detectados otros tipos de VPH no incluidos entre los 13 VPH-AR detectados por la CH2, como en orden de frecuencia; VPH 53, 82, 44, 54, 66 entre otros.

Se observaron infecciones múltiples en una frecuencia de 30,72% (IC<sub>95%</sub> 25,82%-36,10%) de las mujeres analizadas, donde fueron incluidas aquellas que presentaron infección por más de un tipo de VPH.

<b>Tabla 4.3. Frecuencia de los tipos de VPH de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019</b>				
<b>Tipos de VPH</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>VPH-AR CH2*</b>				
<b>VPH 16</b>	47	15,36%	11,75%	19,83%
<b>VPH 31</b>	38	12,42%	9,18%	16,59%
<b>VPH 59</b>	36	11,76%	8,62%	15,86%
<b>VPH 52</b>	32	10,46%	7,51%	14,39%
<b>VPH 51</b>	24	7,84%	5,33%	11,40%
<b>VPH 58</b>	23	7,52%	5,06%	11,03%
<b>VPH 18</b>	20	6,54%	4,27%	9,88%
<b>VPH 39</b>	20	6,54%	4,27%	9,88%
<b>VPH 68</b>	17	5,56%	3,50%	8,72%
<b>VPH 35</b>	16	5,23%	3,24%	8,32%
<b>VPH 33</b>	14	4,58%	2,74%	7,53%
<b>VPH 45</b>	14	4,58%	2,74%	7,53%
<b>VPH 56</b>	12	3,92%	2,26%	6,73%
<b>Otros tipos de VPH**</b>				
<b>VPH 53</b>	24	7,84%	5,33%	11,40%
<b>VPH 82</b>	13	4,25%	2,50%	7,13%
<b>VPH 44</b>	11	3,59%	2,02%	6,32%
<b>VPH 54</b>	11	3,59%	2,02%	6,32%
<b>VPH 66</b>	11	3,59%	2,02%	6,32%
<b>VPH 6</b>	7	2,29%	1,11%	4,65%

<b>VPH 83</b>	7	2,29%	1,11%	4,65%
<b>VPH 70</b>	9	2,94%	1,55%	5,49%
<b>VPH 84</b>	6	1,96%	0,90%	4,21%
<b>VPH 42</b>	4	1,31%	0,51%	3,31%
<b>VPH 55</b>	4	1,31%	0,51%	3,31%
<b>VPH 73</b>	4	1,31%	0,51%	3,31%
<b>VPH 11</b>	3	0,98%	0,33%	2,84%
<b>VPH 69</b>	2	0,65%	0,18%	2,35%
<b>VPH 26</b>	2	0,65%	0,18%	2,35%
<b>VPH 40</b>	2	0,65%	0,18%	2,35%
<b>VPH 34</b>	1	0,33%	0,06%	1,83%

VPH: Virus del Papiloma Humano. \*Tipos de VPH de alto riesgo detectados por Captura Híbrida (CH2). \*\*Incluyen reacciones cruzadas (Infecciones simples y múltiples con otros tipos de VPH no detectados por CH2).

#### 4.3. Frecuencia de tipos de VPH de mujeres según diagnóstico anatomopatológico

En relación a la distribución de tipos detectados según diagnóstico anatomopatológico, se detectaron un 61,36% de infecciones simples y 38,64% de infecciones múltiples en mujeres con lesiones de alto grado y un 70,61% de infecciones simples y de 29,39% de infecciones múltiples en mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor. No se observó diferencia significativa de infecciones múltiples entre las mujeres que presentaron diagnóstico de NIC 2+ comparadas a las que presentaron diagnóstico de NIC 1 o menor ( $p=0,218$ ). En la tabla 6.2 se puede observar la distribución de infecciones simples y múltiples por VPH según diagnóstico de NIC 2+.

**Tabla 4.4. Frecuencia de infecciones simples y múltiples según lesiones de bajo y alto grado de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019**

Tipo de Infección	Mujeres con diagnóstico de NIC 2+				Mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor			
	N	%	IC 95%		N	%	IC 95%	
<b>Múltiple</b>	17	38,64%	24,36%	54,50%	77	29,39%	23,94%	35,31%
<b>Simple</b>	27	61,36%	45,50%	75,64%	185	70,61%	64,69%	76,06%

<b>Total</b>	44	100,00%	100,00%		262	100,00%	100,00%	
VPH: Virus del Papiloma Humano. NIC 2+: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 2 o más (NIC 2, 3 y Cáncer). NIC 1 o menor: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 1 o menor (Negativo y NIC 1).								

Al analizar la frecuencia de tipos de VPH-AR detectados por CH2 en mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor, según presencia de infección múltiple, se observó que el VPH 16 y 31 fueron los más frecuentes, en mujeres sin o con infecciones múltiples. Además, las mujeres con infecciones múltiples presentaron entre los tipos más frecuentes el VPH 51,39 y 18. En la siguiente tabla se observan las frecuencias de tipos de VPH detectados en mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor, incluyendo negativo para lesión escamosa intraepitelial y NIC 1, estratificadas según infecciones simples o múltiples. Entre los tipos detectados por reacción cruzada de CH2 los más frecuentes fueron; el VPH 53 y 66, siendo el porcentaje de reacción cruzada detectada de 18,3% (13,83%-23,55%).

**Tabla 4.5. Frecuencia de los tipos de VPH de mujeres con lesiones de bajo grado con infecciones simples o múltiples, incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019**

Tipos de VPH	184 Mujeres con infección SIMPLE y diagnóstico de NIC 1 o menor				78 Mujeres con infección MULTIPLE y diagnóstico de NIC 1 o menor *			
	N	%	IC 95%		N	%	IC 95%	
<b>VPH-AR CH2*</b>								
<b>VPH 16</b>	20	10,87%	6,77%	16,29%	11	14,10%	7,26%	23,83%
<b>VPH 31</b>	20	10,87%	6,77%	16,29%	11	14,10%	7,26%	23,83%
<b>VPH 52</b>	17	9,24%	5,47%	14,38%	10	12,82%	6,32%	22,32%
<b>VPH 51</b>	13	7,07%	3,82%	11,78%	11	14,10%	7,26%	23,83%
<b>VPH 58</b>	11	5,98%	3,02%	10,44%	9	11,54%	5,41%	20,78%
<b>VPH 59</b>	10	5,43%	2,64%	9,77%	9	11,54%	5,41%	20,78%
<b>VPH 68</b>	10	5,43%	2,64%	9,77%	4	5,13%	1,41%	12,61%
<b>VPH 35</b>	8	4,35%	1,90%	8,39%	7	8,97%	3,68%	17,62%
<b>VPH 39</b>	8	4,35%	1,90%	8,39%	11	14,10%	7,26%	23,83%
<b>VPH 56</b>	8	4,35%	1,90%	8,39%	3	3,85%	0,80%	10,83%
<b>VPH 18</b>	6	3,26%	1,21%	6,96%	11	14,10%	7,26%	23,83%
<b>VPH 33</b>	5	2,72%	0,89%	6,23%	4	5,13%	1,41%	12,61%
<b>VPH 45</b>	5	2,72%	0,89%	6,23%	7	8,97%	3,68%	17,62%
<b>Otros tipos de VPH**</b>								

<b>VPH 53</b>	12	6,52%	3,41%	11,11%	10	12,82%	6,32%	22,32%
<b>VPH 66</b>	6	3,26%	1,21%	6,96%	20	25,64%	16,42%	36,79%
<b>VPH 70</b>	4	2,17%	0,60%	5,47%	5	6,41%	2,11%	14,33%
<b>VPH 82</b>	4	2,17%	0,60%	5,47%	3	3,85%	0,80%	10,83%
<b>VPH 6</b>	4	2,17%	0,60%	5,47%	3	3,85%	0,80%	10,83%
<b>VPH 11</b>	3	1,63%	0,34%	4,69%	0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 84</b>	2	1,09%	0,13%	3,87%	5	6,41%	2,11%	14,33%
<b>VPH 26</b>	2	1,09%	0,13%	3,87%	0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 42</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	3	3,85%	0,80%	10,83%
<b>VPH 44</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	9	11,54%	5,41%	20,78%
<b>VPH 55</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	2	2,56%	0,31%	8,96%
<b>VPH 69</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 73</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	4	5,13%	1,41%	12,61%
<b>VPH 54</b>	1	0,54%	0,01%	2,99%	4	5,13%	1,41%	12,61%
<b>VPH 40</b>	0	0,00%	0,00%	-	2	2,56%	0,31%	8,96%
<b>VPH 34</b>	0	0,00%	0,00%	-	1	1,28%	0,03%	6,94%
<b>VPH 83</b>	0	0,00%	0,00%	-	4	5,13%	1,41%	12,61%

VPH: Virus del Papiloma Humano. \*Tipos de VPH de alto riesgo detectados por Captura Híbrida (CH2).

\*\*Incluyen reacciones cruzadas (infecciones simples y múltiples con otros tipos de VPH no detectados por CH2). NIC 1 o menor: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 1 o menor (Negativo y NIC 1). \*En 5/78 infecciones múltiples se observaron solo otros tipos de VPH no detectados por CH2.

En relación a las frecuencias de tipos de VPH detectados en mujeres con diagnóstico de NIC 2+, incluyendo NIC 2, NIC 3 y Cáncer, estratificadas según presencia de infecciones simples o múltiples, se evidencia en el caso de infecciones simples una alta frecuencia de VPH 16 del 40,74%, seguida por VPH 31 (14,81%). El porcentaje de reacción cruzada detectada por CH2 en mujeres diagnóstico de NIC 2+ fue de 9% (IC<sub>95%</sub> 2,53% -21,67%).

En la siguiente tabla se observan las frecuencias de tipos de VPH detectados en mujeres con diagnóstico de NIC 2+, incluyendo NIC 2, NIC 3 y Cáncer, estratificadas según infecciones simples o múltiples.

**Tabla 4.6. Frecuencia de los tipos de VPH de mujeres con lesiones de alto grado con infecciones simples o múltiples, incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019**

Tipos de VPH	27 Mujeres con infección SIMPLE y diagnóstico NIC 2 +			17 Mujeres con infección MULTIPLE y diagnóstico NIC 2 +		
	N	%	IC 95%	N	%	IC 95%

<b>VPH-AR CH2*</b>								
<b>VPH 16</b>	11	40,74%	22,39%	61,20%	5	29,41%	10,31%	55,96%
<b>VPH 31</b>	4	14,81%	4,19%	33,73%	5	29,41%	10,31%	55,96%
<b>VPH 33</b>	2	7,41%	0,91%	24,29%	3	17,65%	3,80%	43,43%
<b>VPH 18</b>	1	3,70%	0,09%	18,97%	3	17,65%	3,80%	43,43%
<b>VPH 39</b>	1	3,70%	100,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 52</b>	1	3,70%	0,09%	18,97%	4	23,53%	6,81%	49,90%
<b>VPH 59</b>	0	0,00%	0,00%		6	35,29%	14,21%	61,67%
<b>VPH 35</b>	0	0,00%	0,00%		1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 45</b>	0	0,00%	0,00%		2	11,76%	1,46%	36,44%
<b>VPH 51</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 56</b>	0	0,00%	0,00%		1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 58</b>	1	3,70%	0,09%	18,97%	2	11,76%	1,46%	36,44%
<b>VPH 68</b>	2	7,41%	0,91%	24,29%	0	0,00%	0,00%	
<b>Otros tipos de VPH**</b>								
<b>VPH 83</b>	0	0,00%	0,00%		2	11,76%	1,46%	36,44%
<b>VPH 53</b>	1	3,70%	0,09%	18,97%	1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 70</b>	0	0,00%	0,00%		1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 69</b>	1	3,70%	0,09%	18,97%	0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 66</b>	0	0,00%	0,00%		2	11,76%	1,46%	36,44%
<b>VPH 26</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 34</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 40</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 42</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 44</b>	0	0,00%	0,00%		1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 55</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 73</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 82</b>	2	7,41%	0,91%	24,29%	2	11,76%	1,46%	36,44%
<b>VPH 84</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 54</b>	0	0,00%	0,00%		1	5,88%	0,15%	28,69%
<b>VPH 6</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	
<b>VPH 11</b>	0	0,00%	0,00%		0	0,00%	0,00%	

VPH: Virus del Papiloma Humano. \*Tipos de VPH de alto riesgo detectados por Captura Híbrida (CH2).

\*\*Incluyen reacciones cruzadas (infecciones simples con tipos de VPH no detectados por CH2. Todas las infecciones múltiples con otros tipos de VPH poseen al menos un tipo de VPH-AR detectado por la CH2. NIC 2+: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 2 o más (NIC 2, 3 y Cáncer).

#### 4.4. Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16

En 43/306 mujeres, el 14,05% (IC<sub>95%</sub> 10,60%-18,39%) de las mismas se detectó la presencia de anticuerpos contra el VPH 16. Siendo considerada detectable todas aquellas muestras que obtuvieron un resultado por encima de 500ng/ml (punto de corte establecido por el fabricante del kit). En la tabla 4.7 se observa la frecuencia de anticuerpos contra el VPH 16 en mujeres VPH-AR positivas.

<b>Tabla 4.7. Frecuencia de anticuerpos contra el VPH 16 de 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019</b>				
<b>Ac VPH-16 (ng/ml)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>No detectable</b>	263 (1)	85,95%	81,61%	89,40%
<b>Detectable*</b>	43 (4)	14,05%	10,60%	18,39%
<b>Total</b>	306	100,00%		

VPH: Virus del Papiloma Humano, Ac VPH 16: Anticuerpos contra el VPH 16.  
\*Resultados por encima de 500ng/ml (punto de corte establecido por el fabricante del kit)

#### 4.5. Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16 según diagnóstico anatomopatológico

Además, se observó que 8/44 mujeres con diagnóstico de NIC 2+ presentaron anticuerpos contra VPH 16. Mientras que 35/262 mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor, presentaron anticuerpos contra VPH 16. No se observó diferencia significativa entre la presencia de Ac contra VPH 16 y el tipo de diagnóstico anatomopatológico (Tabla 4.8).

<b>Tabla 4.8. Frecuencia de anticuerpos contra VPH 16 según lesiones de bajo y alto grado los tipos en 306 mujeres VPH positivas incluidas en ESTAMPA provenientes del Departamento Central, en el periodo 2014-2019</b>			
<b>Ac VPH-16 -(ng/ml)</b>	<b>Diagnóstico anatomopatológico</b>		<b>N Total (%)</b>
	<b>NIC 2+, N (%)</b>	<b>NIC 1 o menor, N (%)</b>	
<b>Detectable</b>	8 (18,2)	35 (13,4)	43 (14,1)
<b>No Detectable</b>	36 (81,8)	227 (86,6)	263 (85,9)
<b>TOTAL</b>	44 (100)	262 (100)	306 (100)

VPH: Virus del Papiloma Humano, Ac VPH 16: Anticuerpos contra el VPH 16.  
NIC 2+: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 2 o más (NIC 2, 3 y Cáncer).  
NIC 1 o menor: Neoplasia Intraepitelial Cervical menor a grado 2 (Negativo y NIC 1).  
p= 0,39

#### 4.6. Frecuencia de características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos según diagnóstico anatomopatológico

Con respecto a las características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos, no se obtuvo diferencia significativa en el diagnóstico anatomopatológico, con la edad, la escolaridad, la edad de primera relación sexual, el número de parejas sexuales durante toda su vida, uso del preservativo, higiene posterior al coito, antecedente de ITS o consumo de cigarrillos. Sin embargo, se obtuvo diferencia significativa en mujeres que manifestaron haberse realizado el Pap hace más de 5 años ( $p=0,025$ ), en mujeres que presentaron carga viral relativa intermedia o mayor ( $p=0,013$ ) y en mujeres que presentaron infección por el VPH 16 Y 18 ( $p=0,0001$ ), infección por VPH 16,18, 45 ( $p=0,0008$ ), infección por VPH 16,18,45,33,31,52 ( $p=0,00003$ ).

**Tabla 4.9. Frecuencia de características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos según diagnóstico anatomopatológico**

	Diagnóstico NIC 2+ (N=44)				Diagnóstico NIC 1 o menor (N=262)				p
	N	%	IC 95%		N	%	IC 95%		
<b>EDAD</b>									
<41	24	54,55%	38,85%	69,61%	128	48,85%	42,65%	55,08%	0,48
≥41	20	45,45%	30,39%	61,15%	134	51,15%	44,92%	57,35%	
<b>ASISTIO A LA ESCUELA</b>									
Si	43	97,73%	87,98%	99,94%	259	98,85%	96,69%	99,76%	1,0
No	1	2,27%	0,06%	12,02%	3	1,15%	0,24%	3,31%	
<b>EDAD DE PRIMERA RELACIÓN SEXUAL</b>									
<18	20	45,45%	30,39%	61,15%	117	44,66%	38,54%	50,90%	0,92
≥18	24	54,55%	38,85%	69,61%	145	55,34%	49,10%	61,46%	
<b>N° de parejas sexuales durante toda su vida</b>									
<3	19	43,18%	28,35%	58,97%	124	47,33%	41,15%	53,57%	0,56
≥3	23	52,27%	36,69%	67,54%	124	47,33%	41,15%	53,57%	
NS/NR	2	4,55%	0,56%	15,47%	14	5,34%	2,95%	8,80%	
<b>ÚLTIMA PRUEBA DE PAP</b>									
≤5 años	28	65,12%	49,07%	78,99%	201	76,72%	71,12%	81,70%	<b>0,025</b>
>5 años	15	34,88%	21,01%	50,93%	49	18,70%	14,17%	23,96%	
<b>USO DE PRESERVATIVO</b>									

Si	18	40,91%	26,34%	56,75%	103	39,31%	33,36%	45,51%	0,84
No	26	59,09%	43,25%	73,66%	159	60,69%	54,49%	66,64%	
<b>HIGIENE POSTERIOR AL COITO</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
Siempre	40	90,91%	78,33%	97,47%	233	89,27%	84,87%	92,75%	1,00
No siempre	4	9,09%	2,53%	21,67%	27	10,34%	6,93%	14,69%	
NS/NR	0	0,00%	0,00%	0	1	0,38%	0,01%	2,12%	
<b>ANTECEDENTE DE ITS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
Si	3	6,82%	1,43%	18,66%	22	8,43%	5,36%	12,48%	0,94
No	41	93,18%	81,34%	98,57%	237	90,80%	86,63%	94,02%	
NS/NR	0	0,00%	0,00%	0	2	0,77%	0,09%	2,74%	
<b>NUMERO DE EMBARAZO</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
< 3	11	25,00%	13,19%	40,34%	101	38,55%	32,62%	44,74%	0,084
≥ 3	33	75,00%	59,66%	86,81%	161	61,45%	55,26%	67,38%	
<b>CONSUMO DE CIGARRILLO</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
Si	10	22,73%	11,47%	37,84%	36	13,74%	9,81%	18,51%	0,12
No	34	77,27%	62,16%	88,53%	226	86,26%	81,49%	90,19%	
<b>CARGA VIRAL RELATIVA</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
Baja: Menor a 10 URL	8	18,18%	8,19%	32,71%	98	37,40%	31,53%	43,57%	<b>0,013</b>
Intermedia o más: Mayor o igual a 10 URL	36	81,82%	67,29%	91,81%	164	62,60%	56,43%	68,47%	
<b>VPH 16, 18 y otros</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
VPH 16 Y 18	19	43,18%	28,35%	58,97%	46	17,56%	13,15%	22,72%	<b>0,0001</b>
OTROS TIPOS	25	56,82%	41,03%	71,65%	216	82,44%	77,28%	86,85%	
<b>VPH 16,18, 45 Y OTROS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
VPH 16,18,45	20	45,45%	30,39%	61,15%	57	21,76%	16,91%	27,25%	<b>0,0008</b>
OTROS	24	54,55%	38,85%	69,61%	205	78,24%	72,75%	83,09%	
<b>VPH 16,18,45,33,31,52 Y OTROS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>IC 95%</b>		
VPH 16,18,45,33,31,52	35	79,55%	64,70%	90,20%	120	45,80%	39,66%	52,04%	<b>0,00003</b>
OTROS	9	20,45%	9,80%	35,30%	142	54,20%	47,96%	60,34%	
NIC 2+: Neoplasia Intraepitelial Cervical de grado 2 o más (NIC 2, 3 y Cáncer). NIC 1 o menor: Neoplasia Intraepitelial Cervical menor a grado 2 (Negativo y NIC 1).				VPH: Virus del Papiloma Humano ITS: Infecciones de Transmisión sexual URL: Unidades Relativas de Luz					

## **5 DISCUSIÓN**

El Paraguay se encuentra entre los países de la región, con mayor incidencia del CCU, siendo el mismo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en el año 2020 (GLOBOCAN 2020). Si bien como se ha mencionado que la infección por VPH es muy común, solo un pequeño porcentaje de esas infecciones evolucionan a cáncer. Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del CCU (15,26), es la infección por un tipo viral de alto riesgo oncogénico, sobre todo VPH 16. Por ello objetivo general del presente estudio fue determinar la frecuencia de tipos de VPH-AR y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019.

Se detectó un 69,28% (IC<sub>95%</sub> 63,9% - 74,18%) de mujeres con infecciones simples, siendo el tipo de infección más frecuente VPH 16 con 15,36% (IC<sub>95%</sub> 11,75%-19,83%) seguida por el VPH 31. Menor a lo detectado por Bobadilla ML, et al. 2019, con un 23% (IC<sub>95%</sub> 15,17% 32,49%) para VPH 16, seguido del VPH 31 en mujeres VPH-AR de 25 a 64 años. Un factor que podría contribuir a esta diferencia es el rango de edad de las mujeres incluidas en ambos estudios, en el presente estudio se incluyeron en su mayoría (52,3%) mujeres de 30 a 41 años, mientras que en el estudio de Bobadilla et al. 2019 fueron mujeres paraguayas menores a 30 años de edad (38,9%).

Estos resultados se encuentran en concordancia con varios trabajos que han demostrado que mujeres más jóvenes poseen mayor frecuencia de infección por VPH (54,105,106,110,111). Esto es debido a que después de los 30 años, las infecciones que en su mayoría se presentan como transitorias, se van aclarando o resolviendo por el propio sistema inmune de la mujer, solo en algunos casos, se produce una falla en el sistema inmune que lleva a la persistencia de la infección, a eso va acompañado otros eventos como la integración del ADN viral al genoma del huésped, la elevada expresión de onco-proteínas que contribuyen a la progresión neoplásica (112,113).

Se obtuvo una frecuencia de 30,72% (IC<sub>95%</sub> 25,82%-36,10%) de infecciones múltiples con al menos dos tipos de VPH. Frecuencia similar a lo reportado por Cardozo et al. 2012 con un 30,1% (IC<sub>95%</sub> 21,24% 39,98%) de infecciones múltiples, en una población de mujeres paraguayas con y sin lesión (114) y comparable a lo reportado por el estudio de Bobadilla et al 2019 de 29,3% (IC<sub>95%</sub> 16,1%-45,5%), también en mujeres paraguayas.

Las diferencias observadas de frecuencias de infecciones múltiples entre los estudios podrían en parte justificarse por las diferentes características socio-demográficas, clínicas, hábitos, de las mujeres incluidas, entre otros. Es importante considerar que las infecciones con varios tipos de VPH son muy comunes sobre todo en mujeres jóvenes, menores a 30 años de edad con y sin lesión (115), esto es debido a que todos los tipos virales se transmiten por la misma vía, por el contacto o transmisión sexual.

Al mismo tiempo, en el presente estudio no se observó diferencia significativa en la frecuencia de infecciones múltiples observadas en mujeres con y sin diagnóstico de NIC 2+. Este resultado se encuentra en concordancia con un estudio realizado en México incluyendo 59.664 mujeres, donde observaron que no hay evidencia de sinergia entre los tipos de VPH para el riesgo de desarrollo de lesiones de alto grado (116). Esto en parte puede explicarse con lo observado por Quint W. et al 2012, donde en mujeres con infecciones múltiples, se identificó a un tipo viral de alto riesgo oncogénico como el causante de la lesión de cuello uterino detectada, estableciendo de esa forma que un virus, causa una lesión (117).

En el presente estudio luego del VPH 16 se detectaron en orden de frecuencia al VPH 31, 59, 52, 51 y 58. Al analizar los tipos más frecuentes en mujeres positivas para VPH, varios estudios han detectado al VPH 16 como el más frecuente, sin embargo, diferencias en frecuencia de tipos se han detectado a partir del segundo o tercer lugar. Así el estudio de Bobadilla et al., detectó al VPH 16 seguido del VPH-31, 33, 58 y 66.

En el estudio de Ferreccio R. et al 2005 realizado en 1.038 mujeres de 20 a 65 años, reclutadas por censo realizado casa por casa, de Santiago de Chile, detectaron al VPH 16, 56, 31, 58; Nina et al 2009 encontraron que el VPH 16 fue el más frecuente, seguido del VPH 6, 31 y 51, en la población de mujeres danesas utilizando 434 muestras de mujeres que acudieron a hospitales y clínicas de Dinamarca, para un análisis de rutina (115,118). Estas diferencias podrían deberse a desigualdades observadas en las características socio-demográficas, clínicas como diferencias en la frecuencia de mujeres incluidas con lesiones de distinto grado de severidad o más, entre otros.

En relación a la frecuencia de tipos detectados según severidad de lesión de cuello uterino en el presente estudio se observó una frecuencia en infecciones simples de VPH 16 del 10,87% en mujeres de NIC 1 o menos y del 40,74% en mujeres con diagnóstico de NIC 2+. Estos resultados en concordancia con lo reportado por Mendoza LP, et al. 2011, con una frecuencia en infecciones simples del 9% en mujeres paraguayas con lesiones de bajo grado o menos y del 40,7% en mujeres con lesiones de alto grado y del 59,4% en mujeres con CCU (97).

En mujeres con diagnóstico de lesiones NIC 2+, varios estudios han observado que el VPH 16 es el tipo viral más frecuente y con mayor poder oncogénico, y mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales de alto grado (29,119–121). El proceso de carcinogénesis implicado incluye factores como la persistencia viral y posterior integración al genoma del huésped, seguido del aumento en la expresión de las onco proteínas E6 y E7, que contribuyen a la inestabilidad genética y progresión neoplásica. Este hallazgo también es consistente con los resultados de estudios donde las mujeres con infecciones por VPH 16 y 18 tenían un riesgo mucho mayor de desarrollar lesiones cervicales de alto grado (119,121,122). Esto podría justificar en parte la alta incidencia de CCU observada en la población paraguaya.

En el presente estudio se observó que la prueba de CH2 presentó reacción cruzada obteniéndose un resultado positivo para tipos de VPH que no se encuentran entre los 13 tipos de VPH de alto riesgo detectados con las sondas de CH2. Así considerando infecciones simples en mujeres con NIC 1 o menos se observó un porcentaje de 18,3% (IC<sub>95%</sub> 13,83%-23,55%) y en mujeres con diagnóstico de NIC 2+ de 9% (IC<sub>95%</sub> 2,53% -21,67%). Estos resultados se encuentran en concordancia con el estudio realizado por Preisler et al. 2016 que reportaron un 20% de reacción cruzada para CH2, y un 6% de reacción cruzada en mujeres con diagnóstico NIC3+. Se evidenció una notable disminución de reacciones cruzadas en mujeres con NIC2+ donde en el presente estudio todas las infecciones simples presentaron al menos un tipo de VPH-AR detectado por la CH 2. Lo cual podría deberse a que los tipos de VPH causantes de lesiones de alto grado y cáncer, comúnmente son los de alto riesgo incluidos dentro de los 13 tipos de VPH detectado por la técnica de CH2 (84). Por tanto, las reacciones cruzadas podrían explicar en parte que principalmente mujeres con diagnóstico de NIC 1 o menor, positivas para VPH-AR por CH2, posean infecciones transitorias que no progresarán a CCU.

Entre los tipos más frecuentemente detectados en reacciones cruzadas en las infecciones simples de mujeres VPH positivas con NIC 1 o menos se observaron al VPH 53 seguido del 66. Estos resultados son comparables con el estudio de Preisler et al. 2016, donde, al igual que en el presente estudio, encontraron al VPH 53 y 66 como los más frecuentes. Con respecto a las reacciones cruzadas observadas, se manejan algunas hipótesis sobre su causa en mujeres, así Castle et al. 2002 mencionan que los tipos más comunes detectados por reacción cruzada, como el 53, 66, 67 y 70 pertenecen a tres clados filogenéticos del VPH que contienen la mayoría de los tipos oncogénico. Por tanto, la similitud de secuencia entre los tipos pertenecientes al mismo clado podrían en parte explicar la presencia de reacciones cruzadas (84,85).

Por otro lado, en relación a la frecuencia de anticuerpos contra el VPH 16 en las 306 mujeres, se observó un 14,05%. Al comparar los resultados serológicos con los de tipificación se evidenció una probable reactividad cruzada serológica con otros tipos de VPH diferentes a 16. Una posible explicación a dicho fenómeno sería la homología de la secuencia de la proteína L1 entre los diferentes tipos de VPH, lo que sugiere que los anticuerpos contra VPH 16 tendrían una utilidad limitada como marcadores de lesiones de alto grado y cáncer. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ewaisha et al., 2017 y Stanley et al., 2010 que mencionan la limitación de la serología del VPH en el diagnóstico y pronóstico por varios factores como la heterogeneidad del VPH, la variabilidad del ensayo y la evasión inmune viral. (123,124)

En relación a la frecuencia de anticuerpos contra VPH 16 según lesiones, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en las mujeres que presentaban diagnóstico de NIC 2+ ( $p=0,39$ ), resultados en concordancia con varios autores como Tabrizi et al. 2006; Ewaisha et al 2017; Yingji Jin, et al 2018 que mencionan a los anticuerpos contra VPH 16 como un mal predictor de la presencia del VPH 16 asociado a lesiones NIC 2+ en la población de mujeres estudiada (123,125,126). Según lo encontrado por Stanley et al. 2003, la reactividad de anticuerpos contra VPH 16 dirigidos a las oncoproteínas E6 y E7 parece no ser predictiva ni útil para el diagnóstico precoz de cáncer invasivo, al igual que los Ac VPH contra la proteína L1. El posible mecanismo por el cual se produce esta respuesta serológica aún no está bien establecido, por lo cual se requieren de otros estudios para determinar el papel de estos anticuerpos.

Con respecto a la frecuencia de características socio-demográficas, socio-culturales, antecedentes ginecológicos y clínicos según presencia de lesiones, se observó una frecuencia significativamente mayor de mujeres que se habían realizado la última prueba de Pap hace más de 5 años y con diagnóstico de lesiones de NIC 2+. Estos resultados se encuentran en concordancia con el estudio de Rolon et al. 2000 donde reportan que mujeres que no se habían realizado el Pap presentan 26 veces más riesgo en desarrollar cáncer OR: 26,7 (IC<sub>95%</sub> 2,4–296,9)(127). Este hallazgo es importante para el programa de prevención y control de CCU en Paraguay, en donde el cribado basado en citología, posee una cobertura limitada (20%) aunque sea gratuita (60,128).

Al comparar mujeres con o sin diagnóstico de NIC 2+, se observó mayor número de mujeres con diagnóstico de NIC 2+, que poseían 3 o más embarazos, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $p=0,084$ ). En el estudio de Kasamatsu et al., 2019, el cual incluye 694 mujeres VPH-AR positiva de ESTAMPA, se observó que haber tenido 4 embarazos o más se asoció con un mayor riesgo de desarrollar lesiones NIC 2+, con un aumento de casi tres veces (OR:2,72; IC<sub>95%</sub> 1,11-7,45) para las mujeres con más de cuatro embarazos en comparación con aquellas con 0-1 embarazos (tendencia de  $p= 0,05$ ). La diferencia con el estudio de Kasamatsu et al.,2019 pudo deberse a que el presente estudio solo incluyó 306/694 mujeres VPH-AR de ESTAMPA, lo cual demuestra que al aumentar el tamaño la diferencia observada con el número de embarazos y presencia de diagnóstico de NIC 2+ se vuelve significativa. Se ha informado en algunos estudios la asociación de alta paridad con el riesgo de diagnóstico de NIC 2+ (45,129–131), probablemente debido al período prolongado de exposición de la zona de transformación al VPH-AR y/u otros cofactores.

La carga viral relativa intermedia a alta fue otro factor donde se obtuvo una diferencia significativa, presentando las mujeres con diagnóstico de NIC 2+, mayor frecuencia de una carga viral relativa intermedia a alta ( $p=0,013$ ).

En cuanto a la carga viral de VPH-AR, varios trabajos demostraron una diferencia entre los valores de la misma en los diferentes diagnósticos citológicos, sugiriendo que a mayor carga viral existe un mayor riesgo de progresión para LIEAG y CCU (132–134).

Rezhake et al., 2020; incluyó 452 mujeres positivas para VPH-AR de 49 a 69 años por CH2 y comparó el desempeño de diferentes técnicas de triage observando que para mujeres con 50 URL/CO de carga viral relativa, la sensibilidad y especificidad era comparable a la técnica de referencia (citología líquida con ASCUS o más como punto de corte), dando una sensibilidad relativa de 1,04 IC<sub>95%</sub> 0,83 y una especificidad relativa de 0,98 IC<sub>95%</sub> 0,90-1,07, y usando 100 URL/CO mejoró la especificidad 1,16 IC<sub>95%</sub> 1,07-1,25 lo cual fue acompañado de un disminución en sensibilidad pero no significativa para detección de NIC 3+ (0,92 IC<sub>95%</sub> 0,73-1,16). Los resultados del presente estudio al igual que el estudio de Rezhake et al., 2020 sugieren que cuando se realiza el tamizaje para CCU con la prueba de CH2 la carga viral relativa puede ser utilizada para identificar mujeres que presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones

de alto grado de cuello uterino y que deben ir a un control próximo de colposcopia y considerado que estos resultados son proporcionados en el procesamiento por CH2 podría ser una opción a otras técnicas utilizadas como triage como la citología reduciendo los costos. Sin embargo, aún es preciso realizar más estudios principalmente de cohorte de forma a obtener datos más robustos sobre su utilización como prueba de triage.

Además, en el presente estudio fue observada una mayor frecuencia de mujeres con infecciones por VPH 16, 18 ( $p=0,0001$ ), VPH 16, 18 y 45 ( $p=0,0008$ ); VPH 16, 18, 45, 33, 31 y 52 ( $p=0,00003$ ) y diagnóstico de NIC 2+, evidenciando que al incluir los tipos de VPH-AR más frecuentes, la asociación con presencia de lesiones de alto grado se hacía mayor. Similares resultados se han obtenido en otros estudios, Rezhake et al., 2020, Castle et al., 2011 y Lagos et al., 2015, que demostraron un 30% de aumento en la especificidad cuando se utiliza como técnica de triage la detección de VPH 16/18 pero el costo de aproximadamente el mismo porcentaje de reducción en especificidad (32-37%) comparado a utilizar la citología como triage. Sin embargo, cuando se extiende la genotipificación a VPH 16/18/31/33/45 como método de triage se observa similares valores de sensibilidad y especificidad que los obtenidos al utilizar la citología como triage (Rezhake et al., 2020). Estos resultados sugieren la ventaja de utilizar como técnicas de tamizaje pruebas que incluyen resultados de tipificación parcial VPH16/18 y otros VPH-AR o genotipificación extendida VPH 16/18/31/33/45 y otros VPH-AR en identificar mujeres que precisan ser orientadas a un control próximo de colposcopia por presentar mayor riesgo de tener diagnóstico de lesiones NIC 2+ en cuello uterino.

Los resultados del presente estudio sugieren que tanto la carga viral relativa obtenida en la CH2 como la tipificación parcial o extendida de VPH pueden mejorar el manejo de mujeres VPH positivas en el tamizaje. El estudio de Rezhake et al., observó que en algoritmos de triage combinados donde mujeres VPH positivas fueron negativas para VPH 16/18, con resultados negativos para p16 o para citología, tuvieron una probabilidad de desarrollar NIC 3+, menor al 1% lo cual permitiría a estas mujeres pasarlas a un intervalo de control más espaciado.

En concordancia a los resultados del presente estudio sugieren la importancia de realizar otros estudios con mayor tamaño de muestra y de cohorte para analizar en mujeres positivas para VPH en la prueba de tamizaje combinaciones de potenciales biomarcadores como genotipificación de VPH que puedan minimizar los costos de seguimiento y la necesidad de

visitas en mujeres con bajo riesgo de presentar diagnóstico de NIC 2+. Además, los datos obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento epidemiológico y podrían servir de base para estudios que evalúen el impacto de la vacuna en la circulación de tipos de VPH, así como sugieren la importancia de realizar campañas de educación para el fortalecimiento de la prevención.

## **6 CONCLUSIONES**

En relación a los datos epidemiológicos, el tipo más frecuente detectado en las 306 mujeres fue el VPH 16 seguido por los tipos 31 y 59 en la población de mujeres estudiada.

Se detectó asociación entre VPH 16, 18 ( $p=0,0001$ ), VPH 16, 18 y 45 ( $p=0,0008$ ); VPH 16, 18, 45, 33, 31 y 52 ( $p=0,00003$ ) y el diagnóstico de NIC 2+, evidenciándose el rol estos tipos de VPH como potenciales biomarcadores para detección de lesión (NIC2+).

Se observó una frecuencia alta de 30,72% de infecciones múltiples por VPH, sin embargo, no se evidenció asociación de la misma con la severidad de la lesión ( $p=0,218$ ).

Se evidenció una disminución de reacciones cruzadas en mujeres con infecciones simples por VPH y positivas por CH2 del 18,3% para NIC 1 o menor, a 9% para NIC2+, explicando en parte que la mayoría de mujeres con NIC 1 o menor, eliminan la infección sin progresar a NIC2+.

Por otro lado, en relación a la frecuencia de anticuerpos contra el VPH 16 en las 306 mujeres, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en las mujeres que presentaban o no diagnóstico de lesiones de NIC 2+ ( $p=0,39$ ). Lo que indica una utilidad limitada de estos anticuerpos, como biomarcadores para detección de lesión.

Además, se observó una frecuencia significativamente mayor de mujeres que se habían realizado la última prueba de Pap hace más de 5 años y con diagnóstico de lesiones de NIC 2+ ( $p=0,025$ ), evidenciando la necesidad de realizar campañas de educación.

Al comparar mujeres con o sin diagnóstico de NIC 2+, se observó un mayor número de mujeres con diagnóstico de NIC 2+, que poseían 3 o más embarazos, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $p=0,084$ ).

Al igual que algunos tipos de VPH de alto riesgo oncogénico, la carga viral relativa intermedia a alta se asoció con diagnóstico de NIC 2+, ( $p=0,013$ ), sugiriendo un potencial uso como biomarcador para detección de lesión.

Finalmente, los datos obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento epidemiológico y revelan la necesidad de fortalecer campañas de educación en la prevención de CCU, así como, de realizar estudios de cohorte para analizar en mujeres positivas para VPH potenciales biomarcadores como genotipificación, carga viral relativa que puedan minimizar los costos de seguimiento por medio de la identificación de mujeres VPH positivas con mayor riesgo de desarrollar lesión o cáncer, de las que pueden ir a un seguimiento más espaciado.

## **7 PERSPECTIVAS**

- Ampliar el tamaño de muestra a todas las mujeres positivas para VPH-AR incluidas en el estudio multicéntrico ESTAMPA para evaluar el potencial de VPH 16, 18 y tipificación extendida como técnica de triage.
- Comparar nuestros resultados con los obtenidos de detección de anticuerpos contra VPH 16 en suero en el estudio multicéntrico del grupo ABVIRIS de Alemania.
- Analizar otras técnicas más sensibles para la detección de ADN-VPH de alto riesgo en muestras de plasma.

## **8 BIBLIOGRAFÍA**

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. Vol. 384, *Virology*. Academic Press; 2009. p. 260–5.
2. Shope RE, Weston Hurst BE. Infectious papillomatosis of rabbits with a note on the histopathology.
3. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(12):3812–5.
4. Premoli G, González A, Villarreal J, Percoco T, Pietrocino P, Aguilera L. Virus del papiloma humano; visión actual en biomedicina. *Rev ADM*. 2005;62:213–24.
5. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun 20;337(1):76–84.
6. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May;401(1):70–9.
7. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Vol. 324, *Virology*. 2004. p. 17–27.
8. Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SLR, Vaughan K, et al. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer*. 2011 Nov 2;11(1):473.
9. Coggin JR, Hausen H zur. Workshop on Papillomaviruses and Cancer. *Cancer Res*. 1979;39(2 Part 1).
10. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard H-U, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018 Aug;99(8):989–90.
11. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2007;90:1–636.
12. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. Vol. 130, *Indian Journal of Medical Research*. 2009. p. 222–33.

13. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F El, et al. Preventable exposures associated with human cancers. Vol. 103, *Journal of the National Cancer Institute*. 2011. p. 1827–39.
14. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. Vol. 372, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing; 2017. p. 20160273.
15. Graham S V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiol*. 2010 Oct;5(10):1493–506.
16. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Can Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells. *J Virol*. 2006 Sep 15;80(18):8940–50.
17. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. Vol. 32, *Journal of Clinical Virology*. 2005. p. 7–15.
18. Roman A. The human papillomavirus E7 protein shines a spotlight on the pRB family member, p130. Vol. 5, *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc.; 2006. p. 567–8.
19. Barrow-Laing L, Chen W, Roman A. Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology*. 2010 May;400(2):233–9.
20. Culp TD, Cladel NM, Balogh KK, Budgeon LR, Mejia AF, Christensen ND. Papillomavirus Particles Assembled in 293TT Cells Are Infectious In Vivo. *J Virol*. 2006 Nov 1;80(22):11381–4.
21. Fu L, van Doorslaer K, Chen Z, Ristriani T, Masson M, Travé G, et al. Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity. *PLoS One*. 2010;5(9):1–8.
22. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: Infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. Vol. 118, *APMIS*. APMIS; 2010. p. 471–93.
23. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244–65.

24. Madison KC. Barrier function of the skin: “La Raison d’Être” of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003 Aug 1;121(2):231–41.
25. Graham S V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: A comprehensive review. Vol. 131, *Clinical Science*. Portland Press Ltd; 2017. p. 2201–21.
26. Brendle SA, Bywaters SM, Christensen ND. Pathogenesis of infection by human papillomavirus. *Curr Probl Dermatology.* 2014;45:47–57.
27. Sun P, Kang Y, Pan D, Lin F, Dong B, Huang W, et al. Type-specific high-risk human papillomavirus viral load as a viable triage indicator for high-grade squamous intraepithelial lesion: a nested case&ndash;control study. *Cancer Manag Res.* 2018;Volume 10:4839–51.
28. Dalstein V, Riethmuller D, Préteti JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003;106(3):396–403.
29. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):886–91.
30. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.* 2006 Aug 21;24(SUPPL. 3).
31. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, et al. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med.* 2007 Jul;13(7):857–61.
32. Méndez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, Van Den Brule AJC, et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192(7):1158–65.

33. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007 Jun 1;195(11):1582–9.
34. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1796–807.
35. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: Incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003 Feb 1;157(3):218–26.
36. Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, Van Den Brule AJC, Ronderos M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis.* 2004 Dec 15;190(12):2077–87.
37. Koutsky LA, Stevens CE, Holmes KK, Ashley RL, Kiviat NB, Critchlow CW, et al. Underdiagnosis of genital herpes by current clinical and viral-isolation procedures. *N Engl J Med.* 1992 Jun 4;326(23):1533–9.
38. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA.* 2002 Apr 24;287(16):2114.
39. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki A-B. Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix HHS Public Access. *Obs Gynecol Obs Gynecol.* 2012;120(6):1465–71.
40. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A Cohort Study of the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3 in Relation to Papillomavirus Infection. *N Engl J Med.* 1992 Oct 29;327(18):1272–8.
41. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. Vol. 32, *Journal of Clinical Virology.* Elsevier; 2005. p. 16–24.

42. Clifford GM, Gonçalves MAG, Franceschi S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: A meta-analysis. *AIDS*. 2006 Nov;20(18):2337–44.
43. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for Human Papillomavirus Exposure and Co-factors for Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008 Aug 19;26(SUPPL. 11).
44. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2013 Feb;128(2):265–70.
45. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: Results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001 May 4;84(9):1219–26.
46. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):516–20.
47. Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, et al. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: A case-control study nested within the Manchester Cohort. *Br J Cancer*. 2000;83(11):1565–72.
48. Smith JS, Green J, Berrington De Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: A systematic review. *Lancet*. 2003 Apr 5;361(9364):1159–67.
49. Lic.Grettell León Cruz y Dr. Omar de Jesús Bosques Diego. *Revista cubana de obstetricia y ginecología*. *Rev Cuba Obstet y Ginecol*. 2005;
50. Taira A V, Neukermans CP, Sanders GD. Evaluating human papillomavirus vaccination programs. *Emerg Infect Dis*. 2004 Nov;10(11):1915–23.
51. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. *N Engl J Med*. 2002 Nov 21;347(21):1645–51.

52. Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Mar;102(5):325–39.
53. Cheng L, Wang Y, Du J. Human papillomavirus vaccines: An updated review. Vol. 8, *Vaccines*. MDPI AG; 2020. p. 1–15.
54. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, De Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789–99.
55. de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1048–56.
56. Arbyn M, Smith SB, Temin S, Sultana F, Castle P. Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: Updated meta-analyses. *BMJ.* 2018 Dec 5;363:4823.
57. Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *N Engl J Med.* 2015 Feb 19;372(8):711–23.
58. Abbas KM, van Zandvoort K, Brisson M, Jit M. Effects of updated demography, disability weights, and cervical cancer burden on estimates of human papillomavirus vaccination impact at the global, regional, and national levels: a PRIME modelling study. *Lancet Glob Heal.* 2020 Apr 1;8(4):e536–44.
59. Almonte M, Murillo R, Sánchez GI, González P, Ferrera A, Picconi MA, et al. Multicentric study of cervical cancer screening with human papillomavirus testing and assessment of triage methods in Latin America: The ESTAMPA screening study protocol. *BMJ Open.* 2020 May 24;10(5).
60. Mendoza LP, Castro A, Espínola A, Kasamatsu E, Gutiérrez F, Llamosas F AJ. Manual nacional de normas y procedimientos para la prevención y el control del cáncer del tracto genital inferior femenino. *Minist Salud Pública y Bienestar Soc.* 2015;80.

61. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet* (London, England). 2006 Jan 14;367(9505):122–32.
62. Salit IE, Lytwyn A, Raboud J, Sano M, Chong S, Diong C, et al. The role of cytology (Pap tests) and human papillomavirus testing in anal cancer screening. *AIDS*. 2010 May;1.
63. Kotaniemi-Talonen L, Nieminen P, Anttila A, Hakama M. Routine cervical screening with primary HPV testing and cytology triage protocol in a randomised setting. *Br J Cancer*. 2005 Oct 17;93(8):862–7.
64. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJLM, 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 Sep 1;119(5):1095–101.
65. Linder J, Zahniser D. The thinprep pap test. *Acta Cytol*. 1997;41(1):30–8.
66. Pretorius RG 1 BJ. Colposcopia. *Minerva Ginecol*. 2012;64 (2):173–80.
67. Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Dillner J. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results: A meta-analysis of the HPV test positivity rate. Vol. 13, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. *J Cell Mol Med*; 2009. p. 648–59.
68. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Chris CJL, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. Vol. 30, *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2012.
69. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer*. 2013 Mar 5;108(4):908–13.
70. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb 1;136(2):189–97.

71. Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, et al. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. Vol. 76, *Journal of Clinical Virology*. Elsevier B.V.; 2016. p. S14–21.
72. Poljak M, Oštrbenk Valenčak A, Gimpelj Domjanič G, Xu L, Arbyn M. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview. Vol. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. p. 1144–50.
73. Odete Carvalho MO, Almeida RW, S Oliveira LH, B Cavalcanti SM, Maria Baeta Cavalcanti S. Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. Vol. 7, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2003.
74. Lö Rincz AT, Richart RM. Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cytology in Cervical Screening Programs. Vol. 127, *Arch Pathol Lab Med*. 2003.
75. Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM, Berkhof J, Verheijen RHM. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20(2):253–66.
76. Schweizer J, Lu PS, Mahoney CW, Berard-Bergery M, Ho M, Ramasamy V, et al. Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec;48(12):4646–8.
77. Ferrera A, Valladares W, Cabrera Y, de la Luz Hernandez M, Darragh T, Baena A, et al. Performance of an HPV 16/18 E6 oncoprotein test for detection of cervical precancer and cancer. *Int J Cancer*. 2019 Oct 15;145(8):2042–50.
78. Kónya J, Veress G, Juhász A, Szarka K, Sápy T, Hernádi Z, et al. Additional human papillomavirus types detected by the hybrid capture tube test among samples from women with cytological and colposcopic atypia. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):408–11.
79. Peyton CL, Schiffman M, Lö Rincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol*. 1998;36(11):3248–54.
80. Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, Lorincz A. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J Med Virol*. 2001 Sep 1;65(1):155–62.

81. Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, et al. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 May;15(5):908–14.
82. Chan PKS, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. Vol. 49, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* Taylor & Francis; 2012. p. 117–36.
83. Alfaro K, Arrossi S, Campanera A, Cuberli M, Herrero R, Holmes F, et al. Incorporación De La Prueba Del Virus Del Papiloma Humano En Programas De Prevención De Cáncer Cervicouterino. 2018. 1–62 p.
84. Preisler S, Rebolj M, Ejegod DM, Lynge E, Rygaard C, Bonde J. Cross-reactivity profiles of hybrid capture II, cobas, and APTIMA human papillomavirus assays: Split-sample study. *BMC Cancer.* 2016 Jul 20;16(1).
85. Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, et al. Restricted Cross-Reactivity of Hybrid Capture 2 with Nononcogenic Human Papillomavirus Types. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers.* 2002;11(11).
86. Sargent A, Bailey A, Almonte M, Turner A, Thomson C, Peto J, et al. Prevalence of type-specific HPV infection by age and grade of cervical cytology: Data from the ARTISTIC trial. *Br J Cancer.* 2008 May 20;98(10):1704–9.
87. Coutlée F, Mayrand MH, Roger M, Franco EL. Detection and typing of human papillomavirus nucleic acids in biological fluids. Vol. 12, *Public Health Genomics.* Public Health Genomics; 2009. p. 308–18.
88. Gravitt PE, Coutlée F, Iftner T, Sellors JW, Quint WGV, Wheeler CM. New Technologies in Cervical Cancer Screening. *Vaccine.* 2008 Aug 19;26(SUPPL. 10).
89. Karbalaie Niya MH, Keyvani H, Safarnezhad Tameshkel F, Salehi-Vaziri M, Teaghinezhad-S S, Bokharaei Salim F, et al. Human Papillomavirus Type 16 Integration Analysis by Real-time PCR Assay in Associated Cancers. *Transl Oncol.* 2018 Jun 1;11(3):593–8.

90. de Abreu ALP, Malaguti N, Souza RP, Uchimura NS, Ferreira ÉC, Pereira MW, et al. Association of human papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* co-infections on the risk of high-grade squamous intraepithelial cervical lesion. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1371–83.
91. Yu L, Jiang M, Qu P, Wu Z, Sun P, Xi M, et al. Clinical evaluation of human papillomavirus 16/18 oncoprotein test for cervical cancer screening and HPV positive women triage. *Int J Cancer.* 2018 Aug 15;143(4):813–22.
92. Dong L, Lin C, Li L, Wang M, Cui J, Feng R, et al. An evaluation of clinical performance of FTA cards for HPV 16/18 detection using cobas 4800 HPV Test compared to dry swab and liquid medium. *J Clin Virol.* 2017 Sep 1;94:67–71.
93. Wu Q, Zhao X, Fu Y, Wang X, Zhang X, Tian X, et al. A cross-sectional study on HPV testing with type 16/18 genotyping for cervical cancer screening in 11,064 Chinese women. *Cancer Med.* 2017 May 1;6(5):1091–101.
94. Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM, Wheeler CM. Role of HPV genotype, multiple infections, and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(11):1816–24.
95. Rohner E, Edelman C, Sanusi B, Schmitt JW, Baker A, Chesko K, et al. Extended HPV Genotyping to Compare HPV Type Distribution in Self- and Provider-Collected Samples for Cervical Cancer Screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020 Dec;29(12):2651–61.
96. Kasamatsu E, Cubilla A, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, Paez M, Ellen J Klaustermeier, Quint W, Lloveras B, de Sanjose S, Nubia M. and BF. Type-Specific Human Papillomavirus Distribution in Invasive Cervical Carcinomas in Paraguay. A Study of 432 Cases. *J Med Virol.* 2012;84(June):1047–51.
97. Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G et al. Distribution of Human Papillomavirus Genotypes in Paraguayan Women According to the Severity of the Cervical Lesion. *J Med Virol.* 2011;1357(March 2011):1351–7.
98. Mendoza L, Mongelos P, Paez M, Castro A, Rodriguez-Riveros I, Gimenez G, et al. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay: a cross-sectional analytical study. *BMC Infect Dis.* 2013 Nov 9;13:531.

99. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. 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.* 2011 Sep;12(9):880–90.
100. Dijkstra MG, Van Niekerk D, Rijkaart DC, Van Kemenade FJ, Heideman DAM, Snijders PJF, et al. Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: How to manage screen-positive women? a POBASCAM trial substudy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Jan 1;23(1):55–63.
101. 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. *CA Cancer J Clin.* 2012 May;62(3):147–72.
102. GLOBOCAN. CANCER FACT SHEETS - Cervix uteri. Lyon, Francia; 2020.
103. Virginia S, Gómez C, Valenzuela AB, Ii C, Evers S, Iii O, et al. Infecciones de transmisión sexual en mujeres de edad fértil usuarias del Hospital Regional de Villa Hayes, Paraguay Sexually transmitted infections in childbearing age women attending at the Regional Hospital of Villa Hayes, Paraguay. *Investig Cienc Salud Investig Cienc Salud Agosto.* 2015;13(132):39–4939.
104. Mongelos P, Mendoza LP, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. *Int J Infect Dis.* 2015;39:44–9.
105. Bobadilla ML, Villagra V, Zorrilla ME, Olmedo G, Riveros MC, Franco F, et al. Detección y tipificación del Virus Papiloma Humano en el marco del tamizaje virológico para la detección de lesiones del cuello uterino en Asunción, Paraguay. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud.* 2019;17(1):6–15.
106. Kasamatsu E, Rodríguez Riveros MI, Soilan AM, Ortega M, Mongelós P, Páez M, et al. Factors associated with high-risk human papillomavirus infection and high-grade cervical neoplasia: A population-based study in Paraguay. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218016.

107. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS YR. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th editio. Vol. vol 6. Lyon: International Agency of Research on Cancer (IARC). Int Agency Res Cancer; 2014. 169–206 p.
108. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*. 2002 Jul;360(9328):228–9.
109. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual Human papillomavirus laboratory manual First edition , 2009. Vol. 1, WHO Press. 2009. p. 1–124.
110. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah K V., Alonso P, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):412–20.
111. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453–9.
112. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):362–72.
113. Bravo IG, Felez-Sanchez M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Heal*. 2015 Jan 1;2015(1):32–51.
114. Cardozo F, Mendoza L, Páez G, Mongelós P, Castro A, Giménez G. Detección molecular de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para el virus del papiloma humano de alto riesgo Molecular detection of multiple infections in women with and without cervical lesion positive for high ri. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2012;10(2):5–12.
115. MEJLHEDE N, BONDE J, FOMSGAARD A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS*. 2009 Feb 12;117(2):108–14.

116. Wentzensen N, Nason M, Schiffman M, Dodd L, Hunt WC, Wheeler CM. No evidence for synergy between human papillomavirus genotypes for the risk of high-grade squamous intraepithelial lesions in a large population-based study. *J Infect Dis.* 2014;209(6):855–64.
117. Quint W, Jenkins D, Molijn A, Struijk L, Van De Sandt M, Doorbar J, et al. One virus, one lesion - Individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol.* 2012 May;227(1):62–71.
118. Ferreccio CR, Prado RB, Luzoro A V, Ampuera L I S, Snijders PJ, JLM Meijers C, et al. Prevalencia poblacional y distribución por edad del Virus Papiloma Humano entre mujeres en Santiago, Chile.
119. Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, Van Den Brule A, Svare E, et al. The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10630–6.
120. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman MS, Scott DR, et al. The elevated 10-Year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1072–9.
121. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1066–71.
122. De Cremoux P, De La Rochefordière A, Savignoni A, Kirova Y, Alran S, Fourchette V, et al. Different outcome of invasive cervical cancer associated with high-risk versus intermediate-risk HPV genotype. *Int J Cancer.* 2009 Feb 15;124(4):778–82.
123. Ewaisha R, Panicker G, Maranian P, Unger ER, Anderson KS. Serum Immune Profiling for Early Detection of Cervical Disease. *Theranostics.* 2017;7(16):3814–23.
124. Stanley M. HPV - Immune response to infection and vaccination. *Infectious Agents and Cancer.* 2010;5(1).

125. TABRIZI SN, FRAZER IH, GARLAND SM. Serologic response to human papillomavirus 16 among Australian women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May;16(3):1032–5.
126. Jin Y, Choi JW, Kim HJ, Eddouzi J, Kim SC, Ju W, et al. Profiling of serum antibodies against human papillomavirus antigens in Korean women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Med*. 2018;7(11):5655–64.
127. Rolón PA, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer*. 2000 Feb 15;85(4):486–91.
128. Social M de SP y B. MANUAL NACIONAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA PREVENCIÓN Y EL CONTROL. In 2010.
129. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1093–101.
130. Almonte M, Ferreccio C, Gonzales M, Delgado JM, Buckley CH, Luciani S, et al. Risk factors for high-risk human papillomavirus infection and cofactors for high-grade cervical disease in Peru. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Dec 1;21(9):1654–63.
131. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. Burk RD, editor. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0147029.
132. Carvalho MOO, Almeida RW, Leite FMS, Fellows IB, Teixeira MH, Oliveira LHS, et al. Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(2):121–5.
133. Lörincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. Arch Pathol Lab Med; 2003. p. 959–68.

134. Ferreira Santos AL, Mauricette Derchain SF, Martins MR, Zanatta Sarian LO, Zangiacome Martinez E, Syrjänen KJ. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. Sao Paulo Med J. 2003 Nov 6;121(6):238–43.
135. ABVIRIS. PT Monitor - Rapid test for the qualitative detection of antibodies against HPV 16 L1 in whole blood and serum.

## **9 ANEXOS**

## 9.1. Datos sociodemográficos

### DATOS SOCIO DEMOGRÁFICOS ESTAMPA

Código de barras  
participante|

Fecha de visita:  _ _ / _ _ / _ _ _ _  Día Mes Año		Clínica:  _ _			
<b>Deseo tomar algunos minutos para hacerle algunas preguntas acerca de su educación y trabajo</b>					
1. ¿Sabe leer?	1 Sí	2 No	9 NR	<input type="checkbox"/>	
2. ¿Sabe escribir?	1 Sí	2 No	9 NR	<input type="checkbox"/>	
3. ¿Ha asistido alguna vez a la escuela?	1 Sí	2 No (pase a 5)	9 NR (pase a 5)	<input type="checkbox"/>	
4. ¿Cuál fue el grado o nivel de escolaridad más alto que completó?				<input type="checkbox"/>	
1 Primaria incompleta	5 Pregrado/universidad incompleta				
2 Primaria completa	6 Pregrado/universidad completa				
3 Secundaria incompleta	7 Vocacional/técnica				
4 Secundaria completa	9 NR/NS				
5. ¿Cuáles de las siguientes descripciones expresa mejor la situación actual del jefe de hogar (jefe de hogar es el que lleva más dinero a la casa)?				<input type="checkbox"/>	
1 Trabaja	5 Retirado				
2 Desempleado buscando trabajo	6 Hace tareas del hogar, cuida a los niños o a otras personas				
3 Estudia	7 Otro				
4 Enfermo permanente/discapacitado	8 Ni trabaja ni busca empleo				
	9 NS/NR				
6. ¿Cuál es la ocupación del jefe de hogar?				<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
1 Empleado	8 Trabajo temporal				
2 Empleado en oficios domésticos	9 Trabajo de campo: pastoreo, agricultura, etc...				
3 Trabaja en un programa de empleo social	10 Trabajador sin salario: trabaja en empresa familiar sin salario				
4 Empleador (con 5 empleados o menos)	11 Otro				
5 Empleador (con más de 5 empleados)	12 No responde				
6 Profesional o técnico trabajando independiente	13 Jubilado/a				
7 Trabajador independiente pero no profesional (en la casa, comerciante, trabajador de la construcción sin contrato formal de trabajo)	14 No aplica				
7. El agua en su casa:					<input type="checkbox"/>
1 Llega por tubería a la casa	3 Está fuera del terreno				
2 Está dentro del terreno pero fuera de la casa	9 No responde				
8. ¿Tiene baño?					<input type="checkbox"/>
1 Sí	9 No responde				
2 No (pase a 10)					



## 9.2. Cuestionario Factores de riesgo

### CUESTIONARIO DE FACTORES DE RIESGO ESTAMPA

Código barras  
Identificación  
Participante

1. Fecha visita:  _ _ / _ _ / _ _ _ _		Clinica:  _ _	Código entrevistador:  _ _ _ _
Día      Mes      Año			
<p>Quiero tomar unos minutos para hacerle algunas preguntas sobre usted, su salud y sus hábitos. Esta información podría ayudar a comprender mejor la relación entre la infección por VPH y las lesiones cervicales. Quiero recordarle que toda la información que usted proporcione es confidencial y será utilizada únicamente para el estudio. Por último quiero recordarle otra vez que puede negarse a responder cualquier pregunta, sin afectar su participación en el estudio.</p>			
2. Quisiera preguntarle acerca de su consumo de cigarrillos. ¿Durante su vida ha fumado al menos 100 cigarrillos (5 cajetillas) o más?			<input type="checkbox"/>
1 Sí, fuma actualmente	2 Sí, pero ya no fuma	3 No, nunca [Vaya a pregunta 7]	9 NS/NR [Vaya a pregunta 7]
3. ¿A qué edad comenzó a fumar por primera vez?		(99 si NS/NR)	_ _
4. En promedio ¿cuántos cigarrillos fumaba o fuma?  _ _  por			<input type="checkbox"/>
1 Día	2 Semana	3 Mes	4 Año
			9 NS/NR
(Si fuma actualmente vaya a pregunta 7)			
5. ¿A qué edad dejó de fumar?		(99 si NS/NR)	_ _
6. ¿Durante cuántos años fumó cigarrillos? (No incluya lapsos de tiempo en que dejó de fumar)		(99 si NS/NR)	_ _  años       _ _  meses
<p>Las siguientes preguntas son acerca de su historial sexual. Sé que éste es un tema sensible, pero es importante para el estudio. Por favor, tómese el tiempo para recordar esta información con la mayor precisión posible. Me gustaría recordarle que la información que proporcione no se le dirá a nadie.</p>			
7. ¿A qué edad tuvo su primer periodo menstrual?		(99 si NS/NR)	_ _
8. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su primera relación sexual con un hombre?		(00 si nunca ha tenido relaciones sexuales [FIN])	_ _
9. Durante su vida ¿con cuántos hombres diferentes ha tenido relaciones sexuales?			
Si 1 hombre pase a pregunta número 13			
Más de uno pase a pregunta 11			_ _ _
NS/NR vaya a pregunta 10			
10. Diría que han sido			<input type="checkbox"/>
1 2 o 3	2 4 o 5	3 6 o 7	4 entre 8 y 10
			5 Más de 10
			9 NS/NR
11. Durante los últimos 12 meses ¿con cuántos hombres diferentes ha tenido relaciones sexuales?			
Si un número exacto pase a la pregunta 16			
Si NS/NR vaya a pregunta 12			_ _ _

**CUESTIONARIO DE FACTORES DE RIESGO  
ESTAMPA**

Código barras Identificación Participante
---

12. Diría que han sido			<input type="checkbox"/>
1 2 o 3 2 4 o 5 3 6 o 7	4 entre 8 y 10 5 Más de 10 9 NS/NR		
Pase a pregunta 16			
13. Que usted sepa ¿cuál es el número total de mujeres con las que su pareja ha tenido relaciones sexuales, sin incluirse a usted? Si número exacto de mujeres pase a la pregunta 15 Si Otro, vaya a pregunta 14			
			[ ][ ][ ][ ]
14. Diría que han sido			<input type="checkbox"/>
1 2 o 3 2 4 o 5 3 6 o 7	4 entre 8 y 10 5 Más de 10 9 NS/NR		
15. Durante los últimos 12 meses ¿ha tenido relaciones sexuales?			<input type="checkbox"/>
	1 Sí      2 No      9 NS/NR		
Por último, quiero hacerle algunas preguntas sobre sus embarazos y el uso de métodos anticonceptivos, por favor, trate de recordar esta información con la mayor precisión posible.			
16. ¿Alguna vez ha estado embarazada?			<input type="checkbox"/>
	1 Sí      2 No      9 NS/NR Si No o NS/NR Pase a pregunta 18		
17. ¿Cuántas veces?			[ ][ ][ ]
18. ¿Usted y su última pareja, han usado alguna vez un condón?			<input type="checkbox"/>
	1 Sí      2 No      9 NS/NR Si No o NS/NR Pase a pregunta 20		
19. Durante los períodos en que usted y su última pareja usaron condón, lo usaron			<input type="checkbox"/>
1 Cada vez que tuvieron relaciones sexuales 2 La mayoría de las veces que tuvieron relaciones sexuales 3 A veces	4 Rara vez 9 NS/NR		

**CUESTIONARIO DE FACTORES DE RIESGO  
ESTAMPA**

Código barras Identificación Participante
---

20. Para cada uno de los métodos anticonceptivos que se enumeran abajo, por favor indíqueme si usted lo ha usado o no, y en caso afirmativo, por favor dígame ¿qué edad tenía cuando lo empezó y lo dejó de usar y por cuánto tiempo lo usó?

	No	Si	Edad de inicio	Edad en que paró	Tiempo de uso Meses/Años	NR/NS
a. Pastillas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[[ ]	[[ ]	[[ ]/[[ ]	<input type="checkbox"/>
b. Inyecciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[[ ]	[[ ]	[[ ]/[[ ]	<input type="checkbox"/>
c. Implantes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[[ ]	[[ ]	[[ ]/[[ ]	<input type="checkbox"/>
d. DIU	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	[[ ]	[[ ]	[[ ]/[[ ]	<input type="checkbox"/>
e. Otro, especifique _____			[[ ]	[[ ]	[[ ]/[[ ]	<input type="checkbox"/>

21. ¿Ha padecido alguna infección de transmisión sexual?	1 Sí	2 No (Pase a pregunta 23)	9 NS/NR	<input type="checkbox"/>			
22. ¿Qué tipo de infección ha padecido?	1 Sífilis	2 Herpes	3 VPH	4 Hepatitis B	5 Otros . especifique _____	<input type="checkbox"/>	
23. ¿Se higieniza luego del acto sexual?	1 Siempre	2 Casi siempre	3 A veces	4 Rara vez	9 NS/NR	<input type="checkbox"/>	
24. ¿Con qué se higieniza?	1 Agua	2 Agua y jabón	3 Desinfectantes	4 Infusión de hierbas. Especificar tipo	5 Otros, especificar	9 NS/NR	<input type="checkbox"/>
24. a. Especificaciones: _____							
25. Observaciones: _____							

### 9.3. Formulario de cepillado endocervical ESTAMPA

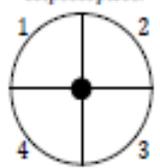
Código de barras  
participante

## FORMULARIO DE CEPILLADO ENDOCERVICAL ESTAMPA

FCEC

CLINICA	
1. Tipo de visita: [ ][ ][ ]	C01 = 1ª visita colpo-VISITA-2 COT = Otra colpo C18 = Colpo final-VISITA-4 C05 = Visita tratamiento colpo
2. Fecha de recolección: [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ][ ][ ] <small>Día Mes Año</small>	3. Edad: [ ][ ]
LABORATORIO	
4. Fecha de recibido en el laboratorio: [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ][ ][ ] <small>Día Mes Año</small>	
5. Calidad de la Muestra: [ ]	<p>1 = Satisfactoria para evaluación (pase a # 6)</p> <p>2 = Satisfactoria pero limitada (pase a # 5a)</p> <p>3 = Inadecuada para evaluación (complete # 5a, #6, 6a y pase a # 10)</p> <p>5a. Especifique la razón: (Marque todas las que apliquen)</p> <p>a. <input type="checkbox"/> Componente de la zona de transformación ausente</p> <p>b. <input type="checkbox"/> Componente epitelial escamoso escaso</p> <p>c. <input type="checkbox"/> Parcialmente/totalmente oscurecida por inflamación</p> <p>d. <input type="checkbox"/> Oscurecida por sangre</p> <p>e. <input type="checkbox"/> Artefacto de secado</p> <p>f. <input type="checkbox"/> Otro, especifique: _____</p>
6. Infección visible? 1 Sí <input type="checkbox"/> 2 No (pase a #10) <input type="checkbox"/>	<p>6a. Tipo de infección: (Marque todas las que aplican)</p> <p>a. <input type="checkbox"/> Herpes</p> <p>b. <input type="checkbox"/> Cándida</p> <p>c. <input type="checkbox"/> Tricomonas</p> <p>d. <input type="checkbox"/> Cocobacilos</p> <p>e. <input type="checkbox"/> Otro, especifique: _____</p>
7. Diagnóstico escamoso	[ ][ ]
8. Diagnóstico glandular/ Otros	[ ][ ]
<p><b>DIAGNOSTICOS ESCAMOSOS</b></p> <p>20 = Dentro de límites normales 21 = Cambios celulares reactivos 30 = ASC-US 33 = ASC, descartar alto grado</p> <p>40 = LIEBG, incluye cambios celulares de VPH 50 = LIEAG (sin especificar) 51 = LIEAG, NIC 2 52 = LIEAG, NIC 3 62 = Carcinoma celular escamoso invasor</p>	<p><b>DIAGNOSTICOS GLANDULARES/OTROS DIAGNOSTICOS</b></p> <p>20 = No otro diagnóstico 21 = Dentro de límites normales 22 = Componente endocervical ausente 90 = AGC, sin otra especificación 91 = AGC, posible neoplasia</p> <p>92 = Adenocarcinoma in-situ (AIS) 93 = Adenocarcinoma, sin otra especificación 94 = Adenocarcinoma endocervical 95 = Otra no-neoplásica 96 = Otra neoplásica (especifique en comentarios)</p>
9. Comentarios: _____	
10. Citotecnólogo/Citopatólogo: [ ][ ][ ][ ]	11. Fecha de diagnóstico: [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ][ ][ ] <small>Día Mes Año</small>
12. Transcrito por: [ ][ ][ ][ ] (si aplica)	13. Fecha de transcripción: [ ][ ]/[ ][ ]/[ ][ ][ ][ ] (Si aplica) <small>Día Mes Año</small>

9.4. Formulario de Colposcopia ESTAMPA

FORMULARIO COLPOSCOPIA ESTAMPA				Código de barras Identificación participante
FC				
1. Fecha visita: [ ]/[ ]/[ ] <small>    Día Mes Año</small>	2. Clínica: [ ] [ ] [ ]	3. Tipo de Visita: [ ] [ ] [ ]	C01=1a COLPOSCOPIA-VISITA 2 C18= COLPOSCOPIA FINAL-VISIT 4	C07=OTRA COLPOSCOPIA C05=VISITA TRATAMIENTO
4. Resultado de citología convencional:		1 No disponible    2 Inadecuada    3 <LIEAG	4 LIEAG+/AGC+ <input type="checkbox"/>	
5. Adecuación colposcópica:		1 Adecuada (pase a 7)    2 Inadecuada <input type="checkbox"/>		
6. Razón de inadecuada: (marque todas las que aplican)		1 <input type="checkbox"/> Cuello uterino oscurecido por inflamación	3 <input type="checkbox"/> Cuello uterino oscurecido por cicatrices	
		2 <input type="checkbox"/> Cuello uterino oscurecido por sangrado	4 <input type="checkbox"/> Otro, especifique _____	
7. Visibilidad de unión escamo-columnar:		1 Totalmente visible    2 Parcialmente visible    3 No visible	<input type="checkbox"/>	
8. Tipo de Zona de Transformación (ZT):		1 Tipo 1    2 Tipo 2    3 Tipo 3	<input type="checkbox"/>	
<b>I. Hallazgos de la colposcopia</b>				
9. Colposcopia:		1 Normal (pase a 10, 0=Normal)    2 Anormal	<input type="checkbox"/>	
9.a. Lugar de la(s) lesión(es):		1 Dentro de la ZT    2 Fuera de la ZT    3 Dentro & fuera de la ZT	<input type="checkbox"/>	
9.b. Posición en el sentido del reloj de la lesión(es):		[ ] [ ] [ ] [ ]	9.e. Dibuje los hallazgos colposcópicos: 	
9.c. Número de cuadrantes cervicales cubiertos por la(s) lesión(es):		[ ]		
9.d. Porcentaje del cuello uterino cubierto por la(s) lesión(es):		[ ] [ ] %		
<b>II. Diagnóstico colposcópico</b>				
10. Impresión colposcópica:		0 Normal    1 Positiva menor (Grado 1/bajo grado)	<input type="checkbox"/>	
		2 Positiva Mayor (Grado 2/alto grado)    3 Sospecha de cancer invasor		
<b>III. Procedimientos</b>				
11. Cepillado endocervical:		1 Sí    2 No	<input type="checkbox"/>	
12. Biopsias:		1 Sí    2 No (pase a 13)	<input type="checkbox"/>	
12.a. Número de biopsia:	12.b. Posición en el sentido del reloj: (use 00 si dentro del canal)	12.c. Orden de gravedad de las lesiones:		
B1 [ ]	B1 [ ] [ ]	[ ]	Gravedad de acuerdo a la impresión colposcópica: 1 MAS SEVERA 2 GRAVEDAD MODERADA/INTERMEDIA 3 MENOS SEVERA	
B2 [ ]	B2 [ ] [ ]	[ ]		
B3 [ ]	B3 [ ] [ ]	[ ]		
B4 [ ]	B4 [ ] [ ]	[ ]		
13. LLETZ:		1 Sí    2 No (pase a 15)    3 Otro tratamiento (especificar en comentarios)	<input type="checkbox"/>	
13.a. Tipo de escisión:		1 Tipo 1 (escisión de la ZT exocervical)	<input type="checkbox"/>	
		2 Tipo 2 (escisión de la TZ exocervical & escisión parcial del canal endocervical)		
		3 Tipo 3 (escisión completa del cuello uterino)		
13.b. Número de especímenes recolectados a enviarse a patología:		[ ] [ ]		
14. Razón para LLETZ:		1 NIC2+ en histología    2 Cepillado endocervical LIEAG+	<input type="checkbox"/>	
		3 Citología LIEAG+ & Colposcopia Positive Mayor (Grado 2)    4 Otro, especifique _____		
15. Comentarios: _____				
16. Colposcopista:		[ ] [ ] [ ] [ ] _____		

## 9.5. Resultado y diagnóstico de biopsia ESTAMPA

Código de barras Identificación Participante
--

### RESULTADO Y DIAGNÓSTICO DE LA BIOPSIA ESTAMPA

RB

CLINICA							
1. Fecha	_ _ / _ _ / _ _ _ _  <small>Día Mes Año</small>		2. Tipo de visita:	_ _ _	C01 = 1ª visita colpo-VISITA-2 C18 = Colpo final-VISITA-4	COT = Otra colpo	
3. Impresión colposcópica: 0 Normal 1 Grado 1 (menor/bajo grado) 2 Grado 2 (mayor/alto grado) 3 Sospecha de cáncer invasor							<input type="checkbox"/>
4 Otro, especifique _____							<input type="checkbox"/>
4. Número de biopsias tomadas: 1 2 3 4							<input type="checkbox"/>
LABORATORIO							
<i>Complete todos los campos posibles en la pregunta 5. Maximice los esfuerzos para identificar la biopsia con peor diagnóstico. Si el tejido es procesado en un laboratorio del estudio, todas las columnas son obligatorias para todos los bloques producidos.</i>							
5.	a. Número de biopsia	b. Tamaño de biopsia (mm) (diámetro x diámetro x profundidad)	c. Número de bloque	d. Número de patología institucional	e. No. total de láminas	f. Código de diagnóstico*	g. Otros hallazgos/comentarios
	_ _	_ _ x _ _ x _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _	_	_ _	
	_ _	_ _ x _ _ x _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _	_	_ _	
	_ _	_ _ x _ _ x _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _	_	_ _	
	_ _	_ _ x _ _ x _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _	_ _ _ _ _ _ _ _ _ _	_	_ _	
*Códigos de diagnóstico: 01 = Negativo 02 = Metaplasia atípica 03 = NIC1/Collocitosis 04 = NIC2 09 = Carcinoma, infiltración no determinada 05 = NIC3 06 = Carcinoma escamoso invasor 07 = Adenocarcinoma invasor 08 = Inadecuada 96 = Otro (especifique)							
6. Diagnóstico más severo: 01 Negativo 02 Metaplasia atípica 03 NIC1/ Collocitosis 04 NIC2 05 NIC3 06 Carcinoma escamoso invasor 07 Adenocarcinoma invasor 08 Inadecuada 09 Carcinoma, infiltración no determinada							<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
7. Comentarios patólogo: _____							
8. Número total de bloques:  _ _  (si se sabe)				9. Número total de láminas Hematoxilina-Eosina:  _ _  (si se sabe)			
10. Número de láminas electrocargadas sin teñir:  _ _  (si se sabe)				11. Número de láminas normales sin teñir:  _ _  (si se sabe)			
12. Fecha diagnóstico:  _ _ / _ _ / _ _ _ _  (si en lab. del estudio) <small>Día Mes Año</small>				13. Código patólogo:  _ _ _ _  (si en lab. del estudio)			
14. Transcrito por:  _ _ _ _  (si aplica)				15. Fecha de transcripción:  _ _ / _ _ / _ _ _ _  (si aplica) <small>Día Mes Año</small>			

## 9.6. Carta de consentimiento informado

### CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO ESTAMPA

Título del estudio: **Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de CCU con pruebas del Virus de Papiloma Humano - VPH (ESTAMPA)**

Realizado por: Grupo de VPH del Departamento de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS – UNA)

Dirección: Dr. Cecilio Díaz c/ Dr. Gaspar Villamayor, San Lorenzo.

Teléfono: 595 971 274 244

Responsable por Paraguay: Dra. Laura Mendoza, IICS-UNA. C.I: 1.196.017.

Patrocinado por: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), Organización Mundial de la Salud (OMS)

Financiado por: IARC – OMS, IICS – UNA, MSP y BS, CONACYT.

Identificación del participante: \_\_\_\_\_

#### **Introducción**

El CCU o cáncer de cuello del útero es un problema de salud importante en nuestro país, y ha sido muy difícil controlarlo. Actualmente sabemos que el cáncer de cuello del útero es causado por una infección con algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH). (Un virus es un organismo muy pequeño no visible al microscopio). Esta infección viral es muy común y las defensas del cuerpo usualmente eliminan la infección durante los dos años siguientes a su adquisición. Sin embargo, algunas mujeres que padecen la infección no la eliminan y podrían desarrollar cáncer.

Actualmente para prevenir el cáncer de cuello del útero se utiliza la prueba de la citología, conocida como Papanicolaou. Esta prueba consiste en examinar las células recolectadas del cuello del útero utilizando un microscopio, para identificar si hay cambios anormales en algunas de ellas. Si se encuentran células con cambios anormales, éstos podrían haber sido causados por algún VPH y pueden representar la existencia de una lesión en el cuello del útero, que si es detectada a tiempo puede ser tratada antes de convertirse en cáncer. Estamos investigando nuevas técnicas que podrían ser mejores que el Papanicolaou para detectar lesiones causadas por el VPH, que, al ser identificadas y tratadas adecuadamente, no se convertirán en cáncer de cuello del útero.

### **¿De qué se trata este estudio?**

Este estudio busca evaluar diferentes estrategias para definir cuál de ellas identifica mejor a las mujeres con riesgo de desarrollar cáncer entre aquellas infectadas con el VPH. Invitaremos a 5000 mujeres entre los 30 y 64 años de edad en (país) y también en otros países, a participar en el estudio. Más de 50.000 mujeres serán invitadas en total.

### **¿Quiénes pueden participar?**

Mujeres entre los 30 y 64 años de edad que ya hayan tenido relaciones sexuales, que no estén embarazadas y que no hayan tenido un parto o aborto (también conocido como “una pérdida”) en los últimos tres meses.

### **¿Que implica para mí participar?**

Si usted acepta participar, en la primera visita le haremos preguntas acerca de sus datos personales. Además, se le realizará un examen ginecológico y se recolectarán muestras de células de su cuello del útero para detectar la presencia del virus (VPH).

La recolección de las muestras es similar a la recolección para el Papanicolaou. Usando las muestras recolectadas, realizaremos la prueba de VPH. Con el objetivo de establecer controles de calidad, las muestras de un pequeño grupo de mujeres pueden ser analizadas con otras pruebas moleculares. Si usted tiene un resultado positivo en la prueba de VPH o en una de las pruebas utilizadas para control de calidad, usted será invitada a continuar con las visitas del estudio. Si su resultado de la prueba de VPH es negativo, usted no será invitada a las siguientes visitas del estudio y por lo tanto debe continuar con sus controles médicos de rutina dentro de su sistema de salud. Es posible que utilicemos las muestras recolectadas en la visita inicial para realizar otras pruebas relacionadas con el virus, pero cualquier remanente no utilizado será desechado. En caso de que usted sea seleccionada para continuar, usted será invitada a una segunda visita para un examen más detallado con un especialista en colposcopia. La colposcopia es una prueba donde un médico especialista examina el cuello del útero a través de un lente especial con una luz para detectar tejidos anormales y decidir si usted requiere tratamiento. Una vez en la clínica de colposcopia, antes de que el médico especialista le realice el examen, le haremos algunas preguntas de su historia personal y su estilo de vida, le tomaremos una muestra adicional de células de su cuello del útero y le solicitaremos que done una muestra de sangre de 10mL. Al igual que las muestras recolectadas en la visita inicial, estas muestras las utilizaremos para evaluar estrategias que puedan identificar a mujeres que estén en mayor riesgo de desarrollar cáncer. En la clínica de colposcopia se le puede ofrecer la posibilidad de que usted colecte su propia muestra cervical. La enfermera le proporcionara un hisopo especial y le explicara claramente cómo utilizarlo. Esta recolección de muestra es fácil, no es dolorosa y no ocasiona ningún riesgo. Inmediatamente antes de la colposcopia, un [médico general/ enfermera] le examinará su cuello del útero luego de aplicarle unas gotitas de ácido acético al 5% o vinagre común, que evidenciarán posibles lesiones al teñirlas de color blanco. Esta técnica se llama inspección visual después de la aplicación del ácido acético (IVA). El resultado de este IVA no será utilizado para decidir su manejo clínico, sólo será registrado para ser comparado con los resultados de las otras estrategias en investigación al final del estudio. Una vez realizado el IVA, el médico especialista le realizará la colposcopia. Para saber si usted tiene enfermedad en el cuello del útero y decidir si necesita tratamiento, es posible que el médico especialista tome una pequeña muestra de tejido llamada biopsia, cuyo resultado utilizará para su diagnóstico. Si la biopsia muestra que usted tiene enfermedad, puede que usted requiera tratamiento, el cual le será explicado por el mismo médico especialista. Basado en sus

resultados, si el médico especialista decide que usted no requiere ningún tratamiento, la invitaremos a una visita 18 meses después para recolectar muestras para una segunda prueba de VPH. En esta visita de seguimiento, también se le podrá ofrecer que usted misma colecte su muestra cervical. La enfermera le explicara claramente este procedimiento. Nuevamente, si esta prueba resulta positiva la invitaremos a otra colposcopia en la cual el médico especialista, una vez más, puede tomar una biopsia y si usted tiene enfermedad ofrecerle tratamiento. Si por el contrario, el resultado de esta prueba de VPH es negativo, le recomendaremos que continúe con sus controles médicos de rutina. El tratamiento más común para las lesiones en el cuello del útero es un LEEP (una pequeña cirugía para extirpar el tejido afectado, realizada bajo anestesia local en el consultorio médico). El LEEP puede causar sangrado, dolor por algunos días, en algunas ocasiones puede causar una infección y en muy raras ocasiones puede afectar la capacidad de quedar embarazada o completar los embarazos en el futuro. Los tratamientos para lesiones en el cuello del útero más severas pueden requerir de hospitalización y su médico se los explicará si los necesita. Estos tratamientos más especializados no forman parte de este estudio y por lo tanto el costo de éstos no será cubierto por el estudio, en cambio, se le ofrecerán dentro de su sistema de salud. La forma en que usted es diagnosticada y tratada se llama “manejo clínico”. Si a usted se le realiza una colposcopia, usted recibirá un manejo clínico más complejo que el que se ofrece de rutina en el país. Es decir, es posible que usted tenga que asistir a más visitas de colposcopia y que le realicen biopsias o tratamientos adicionales. Este manejo clínico ha sido diseñado y revisado por expertos internacionales con el fin de lograr la detección y tratamiento adecuado de todas las lesiones que puedan estar presentes en su cuello del útero.

Le pedimos autorización para almacenar sus muestras, las cuales utilizaremos para la evaluación de otras estrategias que puedan mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero; y para revisar sus registros médicos. Para cualquier evaluación de nuevas estrategias, sólo se usarán sus muestras y algunas notas de sus registros médicos, pero sus datos personales no serán utilizados ni compartidos. Le recordamos que para participar en el estudio necesitamos que nos permita recolectar las muestras en la primera visita. En caso usted no esté de acuerdo con esta recolección, desafortunadamente usted no podrá participar en el estudio, pues estas muestras son esenciales para el estudio. Finalmente le recalamos que su participación es completamente voluntaria y puede retirarse de este cuando quiera o negarse a participar en cualquier parte del estudio, incluyendo responder preguntas sobre su historia personal y estilo de vida o proveer cualquier muestra a excepción de aquellas que se recolectan en esta primera visita. Esto no afectará los servicios que usted recibe dentro de su sistema de salud.

**¿Mi participación tendrá algún costo para mí o recibiré algún pago por mi participación?**

Todos los procedimientos del estudio son completamente gratis o los cubre su sistema de salud. Usted ni pagará, ni recibirá ningún pago por su participación.

**¿Qué muestras serán recolectadas durante el estudio y para qué serán utilizadas?**

Vamos a recolectar tres muestras de células de su cuello del útero durante la primera visita. Si usted es seleccionada para que le hagan una colposcopia, recolectaremos una muestra similar adicional y una muestra de sangre de 10mL durante esa visita de colposcopia. En el caso de que usted sea invitada a una visita a los 18 meses, recolectaremos otra muestra para realizar una segunda prueba de VPH y decidir si usted requiere asistir a colposcopia para ser diagnosticada y quizás recibir tratamiento. Las muestras de su cuello del útero se utilizarán para determinar la presencia de VPH y para estudiar las diferentes manifestaciones del virus en las células que nos pueden ayudar a identificar a las mujeres que estén en mayor riesgo de desarrollar cáncer.

La muestra de sangre se va a utilizar para estudiar marcadores en la sangre de la infección por el VPH, enfermedad de cuello del útero o las reacciones del cuerpo ante el virus y la enfermedad. Es posible que durante la visita de colposcopia el médico especialista tome una biopsia para diagnosticarla y decidir si usted requiere tratamiento. Además, es posible que usted tenga que asistir a más citas de colposcopia en las cuales se pueden tomar otras biopsias o que tenga que recibir tratamientos que incluyan la extracción de tejidos de su cuello del útero. En este caso, le solicitamos su autorización para que los tejidos extraídos durante el diagnóstico y el tratamiento puedan ser revisados por especialistas del estudio. Las muestras serán almacenadas en (institución local). Más adelante algunas de las muestras se enviarán a los laboratorios de nuestros colaboradores o a la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud en Francia, para su almacenamiento a largo plazo, y se utilizarán en la evaluación de nuevas estrategias que puedan servir para mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero. En este documento le pedimos autorización para usar sus muestras en estos estudios futuros y por lo tanto usted no volverá a ser contactada por este motivo en el futuro. Usted sólo recibirá los resultados de las pruebas de VPH recolectadas al inicio de su participación y 18 meses más adelante, si se le realiza; pues ambos resultados determinarán si usted será referida a colposcopia o no. Los resultados de las otras estrategias en investigación no le serán informados porque no serán utilizados para decidir si usted necesita ser tratada o no. Sin embargo, si usted prefiere, puede solicitarlos contactando al investigador principal, (nombre del investigador principal e institución local), quien se los comunicará cuando estén disponibles. Pueden pasar varios años antes de que estos resultados de investigación estén disponibles.

Una vez más le recordamos que sus muestras almacenadas no serán marcadas con información que la identifique. Sólo tendrán un código que permitirá asociarlas con sus otros datos. Le solicitamos su autorización para que sus muestras de tejido recolectadas durante la colposcopia o durante el tratamiento, así como sus registros médicos puedan ser revisados por investigadores del estudio.

### **¿Cuáles son los beneficios de mi participación?**

Los beneficios son:

1. Se le realizarán pruebas de alta calidad para la detección de lesiones que podrían convertirse en cáncer de cuello del útero, bajo la supervisión de un equipo internacional de investigadores.

2. Si usted tuviera una lesión en su cuello del útero, nos aseguraremos de que reciba el tratamiento apropiado, proporcionándoselo como parte del estudio o remitiéndola al servicio de salud apropiado.

### **¿Cuáles son los riesgos de mi participación?**

Los riesgos son:

1. El examen ginecológico es incómodo y en muy pocas ocasiones puede producirle un sangrado ligero muy corto que desaparece espontáneamente.

2. Si usted acude a la cita de colposcopia le realizarán un examen IVA. Este examen requiere la aplicación de algunas gotas de vinagre común que puede producirle un leve ardor muy corto que desaparece espontáneamente.

3. Si usted necesita ir a una visita de colposcopia, y el especialista le toma una biopsia puede que este procedimiento le produzca un leve sangrado sin mayores consecuencias.

4. En el caso de que usted requiera un LEEP, éste le puede causar sangrado, dolor por algunos días, y en algunas ocasiones puede causar una infección; y en muy raras ocasiones puede afectar la capacidad de quedar embarazada o completar los embarazos en el futuro. Este tratamiento con LEEP sólo se realizará si está clínicamente indicado.

### **¿La información que voy a brindar es confidencial?**

Toda la información que brinde, incluyendo los resultados de sus pruebas, será confidencial. Se va a usar un número de estudio que la identificará a usted, sus documentos y sus muestras. La información que permite vincular este número con su nombre se guardará en un lugar seguro y estará disponible únicamente para el personal del estudio.

El investigador principal es responsable de asegurar la confidencialidad de sus datos. Todo el personal del estudio mantendrá la confidencialidad de su identidad y su nombre no aparecerá en ninguna publicación con respecto al estudio o sus resultados.

### **Instituciones, aprobaciones, seguimientos, preguntas adicionales y futuros contactos**

Este estudio está coordinado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer y es realizado en (país) por (nombre de la institución). El estudio es financiado por (nombre de la institución). El protocolo del estudio y el consentimiento informado han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer, por el Comité de Ética e Investigaciones de (institución local) y por el comité de ética de la OPS.

Si tiene preguntas adicionales puede hacerlas y discutir las con el personal del estudio. Si tiene preguntas adicionales puede contactarse con el (nombre), investigador principal del (institución local) en el teléfono (número de teléfono), extensión (número de extensión), o puede contactar al (nombre) presidente del Comité de Ética en el teléfono (número de teléfono), extensión (número de extensión). También puede consultar la página web del estudio [www.xxxxxxx](http://www.xxxxxxx) para más información al respecto.

Es posible que en el futuro la contactemos para invitarla a participar en nuevos estudios. En ese caso le explicaríamos de qué se trata el nuevo estudio y utilizaremos un documento similar a este con la información necesaria para que usted decida si desea participar o no en ese futuro estudio.

He leído el consentimiento informado y este formulario.

Iniciales \_\_\_\_\_

Y sé lo siguiente:

- Que el Virus del Papiloma Humano (VPH) puede causar cáncer de cuello del útero si la infección no es eliminada por las defensas del cuerpo
- Que actualmente es posible detectar las lesiones en el cuello del útero utilizando una prueba que detecta el VPH
- Que en este estudio se investigarán varias estrategias para detectar las lesiones en el cuello del útero que podrían convertirse en cáncer
- Que como parte de los procedimientos del estudio, se me realizarán pruebas y se recolectarán muestras para investigación
- Que si tengo un resultado positivo en la prueba de VPH o en alguna de las pruebas utilizadas para control de calidad, seré invitada a una visita con un especialista en colposcopia, de lo contrario debo continuar mi tamizaje regular dentro de mi sistema de salud
- Que si soy referida a colposcopia, recibiré un manejo clínico diferente al que se ofrece de rutina en el país
- Que mis registros médicos podrán ser revisados por el personal del estudio
- Que si recibo tratamiento para lesiones en mi cuello del útero, el tejido extraído en el tratamiento será revisado por un especialista del estudio
- Que mis muestras serán almacenadas y podrán ser utilizadas en el futuro en la evaluación de nuevas estrategias que puedan servir para mejorar la detección temprana del cáncer de cuello del útero
- Que mi participación es voluntaria y no tendrá ningún costo y que no me pagarán por participar

Los riesgos y beneficios de participar en este estudio

- A quién puedo llamar si tengo dudas o preguntas acerca del estudio

- Que me puedo retirar del estudio en cualquier momento o negarme a cualquier parte del estudio, incluyendo responder preguntas sobre mi historia personal y estilo de vida y proveer muestras adicionales a las recolectadas en esta primera visita, y que esto no representará ningún problema para mí
- Que me pueden ofrecer que yo misma colecte mi muestra cervical y si llega el caso:
  - Sí, acepto participar en este estudio, pero no deseo colectar mi propia muestra

cervical

- Sí, acepto participar en este estudio, y acepto colectar mi propia muestra cervical

Firma de la participante Nombre completo Fecha

Firma del administrador del consentimiento Nombre completo Fecha

Firma del testigo Nombre completo Fecha

*(Para personas con dificultades de lectura/escritura, o por regulaciones locales)*

## 9.7. Manual de operaciones

### MANUAL DE OPERACIONES

**Estudio: “Detección de tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) y de anticuerpos contra VPH-16 en mujeres VPH-AR positivas con y sin lesión, ESTAMPA 2014-2019”**

#### **Principio:**

**Tipificación de VPH en muestras de cuello uterino de mujeres positivas para VPH-AR:** Extracción de ADN por medio de un kit comercial, amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa PCR y tipificación seguida de hibridación reversa. Se realizará siguiendo el manual Human Papillomavirus Laboratory, WHO HPV LabNet First Edition 2009 (109).

**Detección de anticuerpos contra VPH-16 en muestras de suero:** La detección de presencia de anticuerpos contra VPH-16 se realizará por una técnica de inmunoensayo competitivo, en formato de prueba rápida para la determinación cuantitativa de los equivalentes de anticuerpos DRH1 en el suero, siguiendo el protocolo de PT Monitor, Abviris GmbH (135).

#### **Recursos Humanos**

Equipo de Trabajo de Laboratorio, Departamento de Salud Pública (IICS): Bioq. Tania Alfonzo (Alumna de Maestría), Dra. Laura Mendoza (Directora de Tesis), MSc. Pamela Mongelós (Co-directora de Tesis), MSc. Adriana Valenzuela (Co-directora de Tesis), MSc Fátima Cardozo. Para la tipificación de las muestras se tendrá la colaboración del Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Malbrán, Ministerio de Salud Pública, Buenos Aires Argentina. Equipo de Trabajo del Instituto Malbrán, Dra. Alejandra Picconi, Bioq. Jorge Baseletti, quienes proveerán la membrana validada y los controles para realizar en el laboratorio de Salud Pública del IICS, UNA, las actividades de tipificación de VPH por la técnica de PCR seguida de hibridación reversa.

## **Desarrollo del método**

### **1. Toma de muestra**

Las muestras provendrán de un banco de muestras de cepillado de cuello uterino formado en el marco del proyecto ***“Estudio multicéntrico de tamizaje y triage de CCU con pruebas del Virus del Papiloma Humano (ESTAMPA)”***

Se cita brevemente el procedimiento utilizado para la toma de muestra de cuello uterino (*The Thinprep Pap Test, USA*).

1. Introducir el extremo contorneado de la espátula de plástico en el canal cervical
2. Girar 360° alrededor de toda la exocervix y endocervix
3. A continuación, colocar rápidamente la espátula en la solución del vial PreservCyt. Agitar vigorosamente.
4. Transportar los viales de PreservCyt al IICS, UNA y almacenar a 25 C° hasta su procesamiento.

La extracción de ADN se realizará en la sala de extracción de material genético del Laboratorio del Departamento de Salud Pública utilizando el kit de extracción comercial siguiendo las instrucciones detalladas en el kit a partir de una alícuota de muestra tomada del vial de PreservCyt.

**La detección de los tipos de VPH se realizará siguiendo el POE técnico utilizado en el departamento, para la DETECCIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO POR PCR y TIPIFICACIÓN POR HIBRIDACIÓN REVERSA EN LÍNEA (PCR-CHUV) con código DSP-POE-T 03.** Se realizará siguiendo las indicaciones del manual Human Papillomavirus Laboratory, WHO HPV LabNet First Edition 2009 (109).

## **- PROCEDIMIENTO**

### **a) Protocolo PCR-CHUV**

Protocolo para la preparación de la Mix: deben figurar las concentraciones de todos los reactivos utilizados para la preparación de la misma y en el caso particular del Buffer de PCR 10X especificar si contiene MgCl<sub>2</sub> y en caso afirmativo indicar su concentración. También especificar si contiene alguna sustancia para mejorar el rendimiento de la PCR, como ser (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, KCl, etc. Completar las columnas de marca, No de lote y fecha de vencimiento.

Calcular el volumen de cada reactivo por tubo de PCR (columna 1X) teniendo en cuenta las concentraciones finales por tubo que figuran en la última columna y el volumen final de la PCR (50 µl). Con este valor se calcula el volumen total de cada reactivo a cargar en el tubo de la Mix (columna X); éste resulta de multiplicar el volumen de la columna 1X por el número total de tubos de PCR.

Protocolo de cargado de muestras: Se deben utilizar 3 controles negativos: control mix, control agua y control ADN. El control mix será el tubo final de la PCR, conteniendo solamente mix y permitirá detectar una contaminación de los reactivos en el “área Mix”.

El control agua y el de ADN se cargan en la mesada del “área Procesamiento de Muestras” lo que permitirá detectar una contaminación por arrastre durante el cargado de las muestras o contaminación en esa área en particular. Estos controles se distribuyen de manera homogénea entre el resto de los tubos. Si no se completan los 44 tubos, tachar las celdas que sobren.

#### **b) Interpretación De Resultados:**

Para la interpretación de los resultados se utilizará una grilla de resultados. Completar los campos vacíos presentes en el registro. Colocar la placa radiográfica revelada sobre la grilla y utilizando los controles positivos y de quimioluminiscencia (Cq) proceder a centrarla. Una vez ubicada correctamente, la placa radiográfica se fija a la grilla y utilizando una guía (regla) comenzar con la interpretación de los resultados, cruzando el tipo viral, ubicado a la izquierda y derecha de la grilla, con el canal de la muestra ubicado en la parte superior e inferior de la grilla. Estos resultados se utilizarán para completar la planilla de Resultados. Debido al muy bajo fondo que presenta el ECL con este tipo de membrana, pueden ser detectadas señales muy débiles.

#### **c) Expresión Del Resultado:**

El resultado se expresa de manera cualitativa, indicando si la muestra fue “positiva”, “no detectable” o “no apta para el diagnóstico”. En el caso de las positivas, indicar el tipo viral detectado o “tipo viral indeterminado”, de acuerdo al algoritmo.

VPH: positivo. Tipo viral: número del tipo viral / Indeterminado VPH: No detectable.

Muestra no apta para el diagnóstico.

**La detección de anticuerpos contra VPH-16 en muestras de suero, por el test PT Monitor de prueba rápida para la detección cuantitativa de anticuerpos de suero humano contra VPH-16 L1 (Abviris GmbH)(135), se realizará de la siguiente forma:**

1. Añadir a un tubo eppendorf ,50 ul la muestra de suero humano con 200ul del reactivo Monitor de PT y mezclar por pipeteo 5 veces utilizando una punta nueva de 200ul o mayor.
2. Cerrar el tubo con la mezcla, colocarlo en el soporte y permitir incubar la mezcla durante 5 minutos.

3. Durante la fase de incubación, retirar el cassette de prueba de la bolsa, colocarla sobre una superficie plana y etiquetar con el número de identificación de la muestra.
4. Preparar el lector para la medida: seleccionar nueva medición, introducir el ID de la muestra.
5. Después de la incubación de 5 minutos. Añadir 100ul de la mezcla del tubo de incubación, a la derecha y a la izquierda del cassette de prueba, evitar las burbujas.
6. Colocar el cassette en el cajón del lector, tener cuidado de la orientación del cassette, cerrar el cajón y empezar la medición
7. Para la expresión del resultado del ensayo, la línea obtenida en el campo de reacción se mide fotométricamente y se correlaciona con la concentración de anticuerpos contenido en la muestra por medio de datos de calibración específica, curva de calibración, de cada lote. Finalmente, el resultado se expresa en unidades de ng/ml.

## 9.8. Informe de aceptación de protocolo



*Universidad Nacional de Asunción*  
RECTORADO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD  
COMITÉ CIENTIFICO (CC)  
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

---

**INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO**

A : TANIA MABEL ALFONZO SALINAS  
C.C. : LAURA MENDOZA, PAMELA MONGELÓS, ADRIANA VALENZUELA  
Código : P17/2019  
Fecha : 24/06/2019

---

Por la presente informamos que el *protocolo de investigación* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

**"DETECCION DE TIPOS DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO ONCOGÉNICO (VPH-AR), DE ANTICUERPOS PARA VPH-16 Y DE LESIONES DE CUELLO UTERINO EN MUJERES VPH-AR POSITIVAS DEL ESTUDIO ESTAMPA, PERIODO 2014-2019".**

Ha sido aceptado

  
COMITÉ CIENTIFICO (CC)  
Dra. Vivian Giménez  
Coordinadora

  
COMITÉ CIENTIFICO

  
COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)  
Dra. Eva Nara  
Coordinadora

  
COMITÉ DE ETICA

---

Dr. Cecilio Báez c/ Dr. Gaspar Villamayor-Campus Universitario UNA