



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

“Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix  
mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa”

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciada en  
Laboratorio Clínico**

**Autor:**

Arellano Espinoza Gely Odalys  
Marcatoma Guanin Nathalia Isabel

**Tutor:**

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

**Riobamba, Ecuador. 2024**

## DECLARATORIA DE AUTORÍA

Nosotras, Gely Odalys Arellano Espinoza, con cédula de ciudadanía 0605526219 y Nathalia Isabel Marcatoma Guanin con cédula de ciudadanía 1727682807, autoras del trabajo de investigación titulado: Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, certificamos que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedemos a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de nuestra entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 15 de noviembre de 2024

Gely Arellano

Gely Odalys Arellano Espinoza

C.I: 0605526219

Nathalia Isabel Marcatoma Guanin

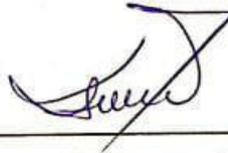
Nathalia Isabel Marcatoma Guanin

C.I: 1727682807

## **DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR**

Quien suscribe, MgS. Yisela Carolina Ramos Campi catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: “Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa”, bajo la autoría de Gely Odalys Arellano Espinoza y Nathalia Isabel Marcatoma Guanin; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los 15 días del mes de noviembre de 2024.



---

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

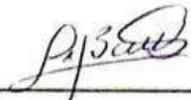
C.I: 1201790456

## CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación "Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa", presentado por Gely Odalys Arellano Espinoza, con cédula de ciudadanía 0605526219 y Nathalia Isabel Marcatoma Guanin con cédula de ciudadanía 1727682807, bajo la tutoría de MgS. Yisela Carolina Ramos Campi, certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

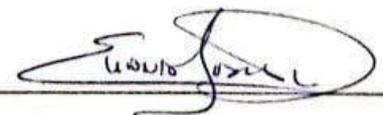
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 15 de noviembre de 2024.

Mgs. Aida Mercedes Balladares Saltos  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---

Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Durán  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---

MsC. Félix Atair Falconí Ontaneda  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO**



---



# CERTIFICACIÓN

Que, **Arellano Espinoza Gely Odalys** con CC: **0605526219**, estudiante de la Carrera **Laboratorio Clínico**, Facultad de **Ciencias de la Salud**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa**", cumple con el **6 %**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **Turnitin**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 16 de octubre de 2024

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi  
TUTOR(A)



## CERTIFICACIÓN

Que, **MARCATOMA GUANIN NATHALIA ISABEL** con CC: **1727682807**, estudiante de la Carrera de **Laboratorio Clínico**, Facultad de **Ciencias de la Salud**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Genotipos del Virus Papiloma Humano de alto y bajo riesgo en cérvix mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa**", cumple con el **6%**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio Turnitin, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 16 de octubre de 2024

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi  
TUTORA

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos, porque me han brindado un constante apoyo en mi formación académica. De manera especial a mi sobrino, que es mi apoyo, mi motivación más grande y a la persona que más amo.

*Gely Odalys Arellano Espinoza*

Dedico con todo mi amor mi tesis a Dios porque gracias a él he logrado concluir mi carrera y con su bendición pude superar cualquier adversidad, a mis padres pues en el transcurso de toda mi vida me han apoyado con su esfuerzo y sacrificio para darme una carrera universitaria además a mis hermanos por creer en mis capacidades y conocimientos, sin ellos no habría logrado alcanzar mis metas.

*Nathalia Isabel Marcatoma Guanin*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios, mis padres y hermanas, porque me han instituido que con esfuerzo y dedicación se puede conseguir grandes cosas, han sido mi inspiración, me han entregado amor y apoyo incondicional para seguir adelante. Sin ellos en todos los ámbitos no hubiera podido llegar hasta donde estoy.

*Gely Odalys Arellano Espinoza*

Le doy gracias a la Universidad Nacional de Chimborazo por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de sí misma, a mis amigos que a lo largo de toda la carrera han estado a mi lado siempre apoyándome y a maestros que hicieron parte de este proceso de formación, que dejan como producto a unos excelentes profesionales, y como prueba viviente en la historia, esta tesis, que perdurará dentro de los conocimientos y desarrollo de las demás generaciones.

*Nathalia Isabel Marcatoma Guanin*

## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	19
Virus del Papiloma Humano .....	19
Fisiopatología.....	19
Transmisión.....	20
Epidemiología .....	21
Manifestaciones Clínicas.....	22
Genética del VPH.....	23
Diagnóstico.....	26
Citología Cervical.....	26
Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (rt)-PCR.....	28
CAPÍTULO III. METODOLOGIA.....	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	43
Conclusiones .....	43
Recomendaciones.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico. ....	19
<b>Tabla 2:</b> Resultados positivos y negativos para VPH.....	34
<b>Tabla 3.</b> Prevalencia de Genotipos de VPH de Alto Riesgo. ....	35
<b>Tabla 4:</b> Prevalencia de Genotipos de VPH de bajo riesgo.....	37
<b>Tabla 5.</b> Número de casos positivos para genotipos de alto de riesgo según la lesión cervical .....	38
<b>Tabla 6.</b> Número de casos positivos para genotipos de bajo riesgo según la lesión cervical .....	39
<b>Tabla 7:</b> Factores predisponentes para el contagio de VPH.....	41

## RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano afecta la piel y las membranas mucosas, incluyendo el tracto genital. La genotipificación se realiza para identificar las cepas específicas de los virus, consideradas de alto riesgo, asociadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer, mientras que las de bajo riesgo pueden causar verrugas genitales, pero raramente se asocian con cáncer. Esta investigación de campo se realizó, con el objetivo de recopilar diferentes muestras cervicovaginales para ser analizadas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa, detectando los genotipos de Virus del Papiloma Humano de alto y bajo riesgo. Es un estudio de tipo, cuantitativo, exploratorio, de campo y no experimental, donde se analizaron muestras de 124 mujeres de la Facultad de Ciencias de la Salud en el periodo 2023-2S, de las cuales 27 presentaban lesiones cervicales importantes las mismas que se analizaron por técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para detección de genotipos de Virus de Papiloma Humano con los resultados se logró alcanzar los objetivos propuestos donde se evidenció, que el genotipo 31 presenta mayor prevalencia con el 12,50% considerándose de alto riesgo oncológico, mientras que dentro de los genotipos de bajo riesgo con un 50% de prevalencia se presenta el genotipo 43, las muestras se analizaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, basada en la tecnología Taqman con el instrumento cuantitativo de fluorescencia, el mismo que demuestra una gran prevalencia de resultados positivos de Virus del Papiloma Humano, siendo esta prueba confirmatoria para un diagnóstico final.

**Palabras Clave:** Virus del Papiloma Humano, Reacción en Cadena de la Polimerasa, genotipificación, cervicovaginal, lesiones cervicales.

## ABSTRACT

Human papillomavirus affects the skin and mucous membranes, including the vaginal tract. Genotyping is used to detect high-risk strains of the virus, which are associated with an elevated chance of developing cancer, whereas low-risk variants can cause genital warts but are rarely related with cancer. This field research was conducted with the aim of collecting different cervicovaginal samples to be analyzed by Polymerase Chain Reaction, detecting high and low risk Human Papillomavirus genotypes. It is a quantitative, exploratory, field and non-experimental study, where samples from 124 women from the Faculty of Health Sciences were analyzed in the period 2023-2S, of which 27 had important cervical lesions, which were analyzed by the Polymerase Chain Reaction technique for the detection of Human Papillomavirus genotypes. With the results, the proposed objectives were achieved, where it was evident that genotype 31 has a higher incidence with 12.50% being considered high oncological risk, while within the low-risk genotypes with a 50% incidence, genotype 43 is present. The samples were analyzed by real-time Polymerase Chain Reaction, based on Taqman technology, with the quantitative fluorescence instrument, which demonstrates a high incidence of positive results for Human Papillomavirus, this test being confirmatory for a final diagnosis.

**Keywords:** Human Papillomavirus, Polymerase Chain Reaction, genotyping, cervicovaginal, cervical lesions.

Reviewed by:



Mg. Mishell Salao Espinoza  
**ENGLISH PROFESSOR**  
C.C. 0650151566

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El VPH es un virus desvainado conformado principalmente por ADN, contando con un diámetro de 52-55 nm, perteneciente a la familia Papillomaviridae. Además, las partículas que conforman este virus poseen cápsides proteicas, que consisten en un 95% de proteína L1 y un 5% de proteína L2, las mismas que se unen para constituir capsómeros icosaédricos, y solo codifica de 9 a 10 tipos de proteínas, logrando carecer de proteasas<sup>1</sup>.

Este virus tiene un tropismo por las células del epitelio plano estratificado de piel es decir los queratinocitos, infectando en especial a las células metaplásicas y células del estrato basal, lo cual es la razón que suele manifestarse en la franja de mutación del cérvix generando así una lesión intraepitelial tanto bajo como de alto grado<sup>2</sup>.

El mismo es el origen de la infección de transmitida sexualmente en personas con sexualidad activa, la misma que antecede a sufrir una lesión intraepitelial escamosa también conocida como LIE, donde la infección procede a ser perseverante coexistiendo con componentes de riesgo que beneficia el crecimiento de lesiones de bajo a un alto grado<sup>3</sup>.

Los principales factores de riesgo para contraer VPH son la inauguración de una vida sexual desde muy jóvenes, con anterioridad a los 14 años, mantener relaciones sexuales sin preservativo, sistema inmune debilitado, otro componente de riesgo para adquirir la infección es haber tenido múltiples parejas sexuales, por lo que se deduce que la infección está estrechamente relacionada con las costumbres sexuales de los individuos<sup>4</sup>.

La genotipificación de los tipos de VPH es necesaria para estudios epidemiológicos y de diagnóstico de las infecciones por este virus en individuos y poblaciones, debido a que, de los diferentes genotipos van a depender factores significativos como la gravedad de la infección, las personas más expuestas y el área de distribución geográfica<sup>4</sup>.

En la actualidad se realizan fundamentalmente tres tipos de metodologías de hibridación de ácidos nucleicos para descubrir los diferentes genotipos de VPH, de los cuales encontramos: las sondas continuas de ácidos nucleicos como Southern Blot, técnicas de acrecentamiento

de blanco como la resistencia en cadena de la polimerasa y el aumento de la señal de hibridación<sup>5</sup>.

Acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el virus tiene una incidencia mundial de 660 casos diagnosticados por año, siendo la cuarta causa de cáncer de cuello uterino y muerte en las mujeres en el año 2022<sup>6</sup>. En Estados Unidos se prevé aproximadamente que 3 de cada 4 féminas entre 15 y 49 años se encuentran infectadas por VPH en el lapso de sus vidas, en cuanto que en Latinoamérica la frecuencia está entre 6,9% - 21,8%<sup>3</sup>.

Se han examinado más de 200 cepas de VPH, de las cuales no todas tienen el mismo potencial oncogénico, clasificándolas en alto y bajo riesgo, por otra parte, la genotipificación del VPH favorece fundamentalmente en la investigación, diagnóstico y monitoreo de los diferentes genotipos de esta infección viral<sup>6</sup>.

Un apartado divulgado de la revista “Cancer Prevention, Hereditary Genetics, and Epidemiology

” menciona que en el Continente Americano el contagio por VPH es un problema significativo debido a que su incidencia es el doble a comparación de otros continentes. Se evaluó los casos que para el 2020 la cifra de incidencia en individuos menores de 65 años es de 72 500 y de 23 100 en personas mayores a 65 años; de la misma manera los casos reportados América son de carcinoma de Cuello Uterino permaneciendo de 20 a 80 casos por cada 100 000 mujeres<sup>7-8</sup>.

En Sudamérica en una investigación ejecutado en Venezuela se evidenció que en hombres y mujeres supuestamente saludables existió una gran incidencia del genotipo 16 en la población femenina, mientras que en hombres el genotipo 18 fue el más representativo, por otra parte, una publicación perpetrada en la ciudad de Carabobo alrededor de 1999 y 2009 se identificó que el genotipo 45 era el que presentaba mayor incidencia<sup>9</sup>.

En una investigación elaborada por Ramos<sup>10</sup>, en estados latinoamericanos como Colombia, Brasil y Argentina se observó una mayor frecuencia, 97,43% en Colombia, 83,33% en Argentina y 72,35% en Brasil, asimismo se constató que el genotipo encontrado en más prevalencia en Argentina fue el 16, por otra parte, en Colombia fue de la misma forma el 16, posteriormente en Brasil fueron los genotipos 16, 26, 31 y 33<sup>10</sup>.

Los estudios iniciales de genotipificación en Ecuador se dirigían a la identificación de los tipos de VPH asociados con verrugas genitales y otras lesiones benignas, posterior se identificaron ciertos tipos de alto riesgo, que se asocian con un alto riesgo de cáncer cervical, de esta manera las pruebas de detección de este contribuyen a mejorar la observación de la salud de los individuos femeninos y la prevención del cáncer cervical<sup>11</sup>.

Estas pruebas permitieron la identificación de la presencia del virus, pero inicialmente no se realizaba una genotipificación exhaustiva de los tipos. Ecuador ha adoptado tecnologías más avanzadas para la genotipificación del condiloma acuminado, como la (PCR) en tiempo real, esta técnica consiente una identificación más precisa de los especímenes en muestras cervicovaginales<sup>11</sup>.

En el 2015, en Ecuador las mujeres en edad fértil aproximadamente el 50% eran sexualmente activas y presentaban una infección, de las cuales el 1% presentaba verrugas genitales, un 4% posee lesiones intraepiteliales de bajo o alto grado en cérvix y el 8,41% murieron por cáncer cervicovaginal. Esta enfermedad oncológica, es la segunda causa de muerte en Ecuador<sup>12</sup>.

En la investigación llevada a cabo por Zapata<sup>11</sup>, en la UFSQ, titulada "Genotipificación del Virus de Papiloma Humano en mujeres que asisten a dos centros médicos privados entre 2013 y 2017", se encontró que el 82,6% de las señoras mayores de 40 años presentaban genotipos de alto riesgo. Además, se igualaron 14 serotipos de mayor riesgo, siendo los más prevalentes el 31 (19,5%), 52 (18,6%), 53 y 58 (16,1%)<sup>11</sup>.

En Chimborazo no se inspeccionan datos puntuales sobre la inoculación por VPH, no obstante, Págalos y Ramírez<sup>13</sup>, en el año 2016 – 2018 realizaron una investigación en donde se determinó, que coexiste una apariencia reveladora en los genotipos 16 y 18 en la localidad de Riobamba, mientras que según datos de Solca<sup>13</sup>, en diferentes localidades como Quito con el 18,5% al igual que el 17,2% en Guayaquil el carcinoma uterino es de los carcinomas habituales.

Existen otros estudios recientes realizados donde se mostraron una baja incidencia de cáncer cérvico uterino en la provincia por lo que de esta manera se realizan pruebas de detección

de VPH como parte de los programas de salud pública para mujeres en donde el ensayo más manejado es la citología cervicovaginal seguido de la genotipificación del virus<sup>14</sup>.

Sin embargo, a pesar de los diferentes estudios que existen sobre la prevalencia de genotipos de VPH ejecutados en los desemejantes territorios del Ecuador, no concurre una publicación que reúna todos estos datos, como derivación, al no poder dilucidar de manera contigua se pueden formar errores en la administración de este problema de salud en el país<sup>11</sup>.

Según la normativa Ecuatoriana en el artículo 17 del reglamento del marco jurídico y dependiente de la directiva acuerda: “Aprobar y ejecutar los Protocolos para la detección oportuna del cáncer de cuello uterino, elaborada por el Ministerio de Salud Pública” y “Disponer que los protocolos para la detección oportuna del cáncer de cuello uterino sean aplicables a nivel nacional como una normativa del Sistema Nacional de Salud”, Lo cual incluiría la detección temprana del VPH por medio de la genotipificación del virus en muestras citológica de en mujeres expuestas a diferentes factores de riesgo<sup>15</sup>.

La infección causada por el VPH se ha transformado en un cuestionamiento significativo de salud pública, por lo cual, se ha reconocido a la población expuesta a los diferentes factores de riesgo, por lo que se rigen todas las estrategias de prevención y diagnóstico anticipado, además de la aplicación de técnicas de genotipificación para determinar el grado oncológico.

Es forzoso acrecentar las operaciones de educación y las culturas de tamizaje en estos conjuntos de pacientes de supuesto bajo riesgo cómo las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo con el fin de hacer diagnósticos tempranos, tratamientos menos agresivos y más efectivos.

Las beneficiarias fueron las alumnos de los últimos periodos de las diferentes cátedras de la institución ya que al ser una población joven y mantener una vida sexual activa están relacionadas con varios factores de riesgo como mantener contacto sexual a temprana edad, tener varias parejas sexuales, tabaquismo, anticoncepción prolongada, uso inadecuado del preservativo o un sistema inmunitario debilitado, por ende, los factores se relacionan con el comportamiento sexual a largo de la vida y están expuestas a contraer VPH.

Contraer VPH se convierte en un problema de salud, psicológico, social y económico por lo que, la identificación del condiloma acuminado de alto riesgo con mayor grado oncológico y genotipos de bajo riesgo más relevantes, por medio de la PCR en las estudiantes del periodo 2023- 2S ayudó a identificar los tipos específicos de VPH.

Lo cual permitió identificar patrones específicos de genotipos asociados con mayor amenaza de desarrollar lesiones y carcinoma cervicales, ya que esta diversidad de genotipos puede influir en la variabilidad de la respuesta inmune y la gravedad de las infecciones, además contribuyó a mejorar las estrategias de vacunación y prevención contra el VPH al conocer los genotipos predominantes en una población específica.

El capítulo II fue conformado por literatura encontrada según el tema de investigación gozando de modelos y teorías que conforman el marco teórico, de igual manera se tomó en cuenta otras investigaciones realizadas en base al tema de investigación y se interpretó conceptos que fueron utilizados a lo largo del trabajo de investigación.

El Capítulo III, detalló el marco metodológico, el mismo que, describió el enfoque cuantitativo a partir de datos estadísticos recolectados en la investigación, con un nivel descriptivo, diseño de campo, no experimental, secuencia y cronología de los hechos, fundamentándose a través de los fenómenos observados, las características, clasificación y factores de riesgo del VPH, de igual manera se explica la población, muestra y criterios de inclusión y exclusión.

El capítulo IV, mostró todos los resultados derivados a lo largo de la exploración los cuales se presentan de manera ordenada y detallada, además de que cada dato es presentado con su análisis e interpretación así mismo los datos recopilados se compararon con resultados de otras investigaciones con temática similar, finalmente los resultados se vincularon a los objetivos planteados en la investigación.

El capítulo V, presenta las conclusiones a las que se llegó en base a la investigación realizada y según los objetivos planteados, además, plantea las recomendaciones en base a lo observado a lo largo del trabajo de investigación, por último, se incluyó la bibliografía y anexos generados durante la investigación.

Por lo que por medio del presente trabajo se tuvo por objetivo tipificar los genotipos de VPH, mediante técnicas moleculares en muestras cervicovaginales de estudiantes pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Salud; esto será cumplido siguiendo los siguientes ítems:

- Constatar la presencia de los genotipos de VPH a través de la técnica de PCR en tiempo real en las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo para clasificarlos en genotipos de alto y bajo riesgo.
- Analizar la relación entre los resultados de la citología cervicovaginal y la genotipificación del VPH de alto y bajo riesgo por medio de la aplicación de matrices comparativas en las estudiantes participes de la investigación, para corroboración de las pruebas moleculares como diagnóstico confirmatorio.
- Valorar la relación entre la presencia de genotipos de VPH y los factores predisponentes obtenidos mediante un formulario aplicado, para correlacionarlo con el factor de mayor prevalencia presente en las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### Virus del Papiloma Humano

Es un virus no envuelto que conserva una cápside de 0.0006 milímetros de forma icosaédrica conformada por 72 capsómeros, en la parte interna de esta se halla la información genética del virus el cual consta de un ADN de doble cadena y radial de al menos 8000 pares de bases y sus viriones llegan a resistir sustancias como éter, ácido y condiciones físicas como calor de 50 °C<sup>16</sup>.

El VPH según su taxonomía pertenece a la familia Papillomaviridae la misma que clasifica diferentes géneros según la afinidad que muestren con los tejidos humanos, además la clasificación de los genotipos de VPH también se relaciona con su nivel oncogénico clasificándose en serotipos de bajo riesgo y alto riesgo (Tabla 1)<sup>17</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico.

Riesgo	Genotipos
Alto Riesgo	16, 18, 33, 39, 45, 59, 35, 66, 51, 52, 53, 68, 31, 56, 58, 26, 82, 73
Bajo Riesgo	6, 11, 81, 42, 43

### Fisiopatología

La infección comienza cuando el virus entra en el tejido a través de heridas en la piel. Se ha observado que las células uterinas y anales son mayormente susceptibles a sufrir lesiones durante el acto sexual, lo que las hace más accesibles para iniciar la enfermedad. Después de la entrada del virus, comienza su ciclo de vida, durante el cual los diferentes genotipos de VPH pueden codificar tanto proteínas tempranas como tardías<sup>18</sup>.

El proceso oncogénico se clasifica en dos fases: una inicial, denominada fase de expansión, y una posterior o de replicación. El proceso inicial comienza con el ingreso de viriones en la célula del hospedador, seguido de su migración hacia los queratinocitos a través de la proteína L1, para luego integrarse en el núcleo celular, donde inicia la manifestación de los genes tipo E<sup>19</sup>.

Las proteínas catalogadas E1 y E2 tienen la función de regular la cantidad de copias, mientras que las proteínas E5 a E7 son responsables de la proliferación y transformación en la célula. En particular, la proteína E7 activa el agente de transcripción E2F, se une a él y posteriormente comienza la replicación genética del virus<sup>20</sup>.

En la fase tardía, se inicia la duplicación del ADN y se aumenta la manifestación de los genes que codifican E6 y E7, las cuales son cruciales en la transformación celular y en la inhibición de la apoptosis. La proteína E6 degrada a p53, que en condiciones normales induce la apoptosis en células sanas. La ausencia de p53 provoca un descontrol en el ciclo celular, lo que favorece el desarrollo del cáncer<sup>20</sup>.

### **Transmisión**

El individuo adquiere la infección por contacto directo es decir por el roce entre la epidermis y fluidos por lo general por ruta sexual, también puede existir un contagio vertical a través de la placenta o en el momento del parto donde el recién nacido va estar directamente expuesto a fluidos cervicales de la madre, la supervivencia del virus fuera de un organismo es limitada por lo que no puede adquirirse al entrar en contacto con superficies como baños o duchas pero si es posible adquirir la infección por el contacto directo de juguetes sexuales<sup>21-22</sup>.

La transmisión por saliva es posible de la misma manera por medio de los ovarios, semen, endometrio demostrando que se puede adquirir una infección por VPH tanto durante como después de la fertilización, el contagio más frecuente es de mujer a varón con el 17,5 % mientras que de varón a mujer es solo del 5% además, el traspaso de mujer a hombre por vía rectal es del 47% a diferencia del contagio de hombre a mujer por vía vaginal con un 28% demostrando que la contaminación de mujer a varón es más frecuente<sup>22-23</sup>.

Una investigación nueva ha documentado la infección por VPH en los profesionales de la salud que tratan lesiones genitales. Se evidenció que lo mismo, puede ocurrir debido a la transmisión aérea del ADN viral a través del humo quirúrgico. No obstante, este asunto sigue existiendo como objeto de controversia, ya que la acción sexual sigue siendo la vital vía de contagio, y hay pocos informes al respecto<sup>24</sup>.

## **Epidemiología**

La infección por VPH se ha convertido en el padecimiento de transmisión sexual más común en la última década con una gran diseminación y prevalencia a nivel mundial de 630 millones aproximadamente y cada año se reportan aproximadamente 6 millones de casos nuevos, la probabilidad de contraer la enfermedad en personas con una sola pareja sexual es del 49,1% y esto aumenta al 99,9% cuando el individuo tiene más de 5 parejas sexuales y llega al 100% cuando a la cifra de parejas sexuales es mayor a 15 en un año<sup>16</sup>.

El predominio de la infección por VPH alcanza el punto máximo en mujeres de 15 a 19 años, mientras que, en mujeres de 55 años o más se observa un ligero aumento, que se atribuye a la reacción o aceleración del virus. En el caso de las mujeres, la infección por VPH se revela mediante la aparición de lesiones cervicales, lo que puede llevar a la formación de lesiones de alto grado que, eventualmente, pueden evolucionar hacia un carcinoma cervical<sup>25-26</sup>.

En el pasado, el carcinoma cervical tenía un hecho de 7 por cada 100,000 mujeres anualmente, pero en mujeres infectadas por el VIH, esta cifra podía aumentar hasta 40 de 100,000. Sin embargo, en los años transcurridos, se han apuntado cambios relevantes en la incidencia de distintos carcinomas, con un aumento del 2.5% en los casos de carcinoma orofaríngeo y anal<sup>17</sup>.

La tasa de infección en hombres es comparable o incluso superior a la de los individuos femeninos, debido que las ilustraciones indican el contagio por VPH varía entre el 1,3% y el 72,9%. A pesar de esto, en los hombres, las infecciones asumen menor probabilidad de mantenerse en comparación con féminas, dado que el 75% de contagios se resuelven en los 12 meses siguientes a su adquisición.<sup>17</sup>

En individuos heterosexuales, el 95% de los contagios por VPH se delimitan en el pene y el escroto, siendo el genotipo 16 el más usual. En cambio, en hombres homosexuales, la frecuencia estadística indica que la infección anogenital corresponde al 63,9%, de la cual el 37,2% incumbe a genotipos cancerígenos. En el plano oral, la prevalencia es del 17,3%, con un 9,2% de los casos asociados a genotipos de alto riesgo<sup>28</sup>.

## **Manifestaciones Clínicas**

Se pueden presentar manifestaciones clínicas tanto benignas como malignas debido al grado oncológico de los 200 genotipos que pueden afectar células de la piel y fluidos corporales, los genotipos de disminuido riesgo son autores de verrugas o también conocidos como condilomas perturbando a hombres y mujeres en la zona externa genital, mucosa oral, zona anogenital, etc. Mientras que los genotipos de alto grado están estrechamente relacionados con carcinomas de diferentes tipos como el carcinoma del tracto anogenital, mucosa orofaríngea, carcinoma cervical, cáncer de vulva, neoplasia de cabeza y cuello, sarcoma de pene entre otros<sup>29-30</sup>.

## **Cáncer de cuello uterino**

El carcinoma uterino, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), sigue siendo una contrariedad de salud global con un impacto significativo en la población femenina, sin importar su cultura o región. A pesar de los avances en programas de detección temprana y prevención, muchas mujeres continúan sufriendo y muriendo debido a esta enfermedad, lo que refleja las barreras persistentes en el acceso a cuidados médicos<sup>31</sup>.

Este cáncer, que se origina en la zona de transformación uterina, comienza como lesiones de bajo grado. Si no son diagnosticadas y tratadas a tiempo, estas lesiones pueden evolucionar a lesiones de alto grado, lo que incrementa significativamente el riesgo de desarrollar metástasis<sup>32</sup>.

En el año 2018, el carcinoma uterino estuvo en el ranking cuatro de los carcinomas diagnosticados y uno de los más significativos en mortalidad entre las mujeres, con cerca de 570,000 casos y 311,000 muertes. Del total de fallecimientos, el 90% ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, afectando mayormente a mujeres entre los 40 y 50 años. Aunque el VPH es un agente clave en este tipo de cáncer. Sin embargo, los genotipos 16 y 18 del VPH son especialmente peligrosos, ya que son responsables del 70% de los casos debido a su alta capacidad oncogénica<sup>33</sup>.

La mayoría de las mujeres con sistemas inmunológicos saludables que contraen HPV logran eliminarlo de su organismo con el tiempo y no presentan síntomas. No obstante, los signos del cáncer de cuello uterino suelen tardar entre 15 y 20 años en aparecer, lo que indica que

la enfermedad ha avanzado considerablemente. En las fases iniciales o en el estado precanceroso, no suelen manifestarse síntomas evidentes. Sin embargo, cuando la enfermedad progresa, pueden presentarse síntomas graves como sangrado vaginal anormal, especialmente después de las relaciones sexuales, secreciones inusuales mezcladas con sangre, dolor durante el acto sexual (dispareunia) y dolor en la región pélvica<sup>34-35</sup>.

Según la OMS y la OPS, la neoplasia uterina se diagnostica mediante varias pruebas, como el Papanicolaou, la citología líquida (LBC), la colposcopia, biopsia, y la detección del virus del HPV mediante técnicas moleculares como la PCR. En Ecuador, se realizan tamizajes citológicos en mujeres entre 21 y 35 años, mientras que las pruebas de PCR o captura híbrida se aplican a mujeres de entre 30 y 65 años que previamente hayan obtenido resultados positivos<sup>35</sup>.

## **Genética del VPH**

### **Genoma y proteínas**

Es un virus de ADN circular, este virus no tiene envoltura, su diámetro es de 52-55nm, tienen una cápside proteica, las mismas que están conformadas por la proteína L1 en un 95% y por L2 en un 5%, las mismas que se juntan y dan formación a capsómeros icosaédricos<sup>36</sup>.

La Cápside del genoma del virus tiene aproximadamente 8000 pares de bases y está compuesto por 8 genes, junto con una región regulatoria no codificante llamada LCR. Esta región contiene sitios específicos donde se unen factores proteicos y hormonales del huésped, los cuales son esenciales para que el virus ejecute su ciclo de replicación<sup>36</sup>.

Según la similitud de la secuencia genómica, se han encontrado más de 200 tipos de VPH, de los mismos que se puede considerar un 10% de diferencias en el gen L1 altamente conservado, se puede dividir el VPH en cinco géneros ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\nu$ ), de los mismos el grupo  $\alpha$ -papiloma virus, es el que infecta la mucosa epitelial, también se puede diferenciar el virus por el potencial oncogénico, ya sea de tipo de alto riesgo o bajo riesgo<sup>37</sup>.

La utilización de la corrección del ADN polimerasa del huésped para la replicación de este Virus se debe a que tiene un ADN bicatenario, evitando las altas tasas de mutación; de esta manera los cambios en los genomas del VPH han sido lentos, definiendo tipos de VPH cuyo

ciclo de infección se ha adaptado a diferentes células huésped. Eventualmente las mutaciones aleatorias que ocurren dentro de los tipos virales han generado los polimorfismos de nucleótidos contenidos en las variantes intratipo del VPH<sup>37</sup>.

### **Ciclo de Replicación**

El Virus del VPH en su genoma, está constituido por dos tipos de genes, los genes E (Early) los cuales aparecen en las fases prematuras de la infección, y se expresan a partir del epitelio basal indiferenciado, estos codifican las proteínas implicadas en la replicación y regulación viral, pero también están presentes en la capacidad carcinogénica, y los genes L (Later), los cuales como su nombre indica aparecen en las etapas tardías del ciclo replicativo<sup>36</sup>.

El Virus del Papiloma Humano en su ciclo replicativo, depende del proceso de diferenciación del epitelio, de esta manera los genes E1 y E2 normalizan la replicación genética y en especial el E2, al igual que, interviene en la locución de las proteínas oncogenes del gen E6 y E7<sup>37</sup>.

Los genes E6 y E7 del VPH codifican oncoproteínas que desactivan las proteínas p53 y pRb de manera secuencial. Esta desactivación provoca una desregulación en el período celular, lo que lleva a la metamorfosis neoplásica del tejido infectado. Durante las primeras etapas de la infección, el VPH permanece relativamente inactivo, pero impide que la célula entre en un estado de reposo (fase G0)<sup>38</sup>.

Estas células infectadas crecen y maduran, el gen E2 regula la evolución de los genes del periodo temprano al periodo tardío de la infección. Esto permite que el virus acreciente la fabricación de viriones, favoreciendo su diseminación. Este incremento en la fabricación viral en las lesiones causadas por el VPH suele manifestarse como una hipertrofia del tejido afectado (lesiones engrosadas, como las verrugas comunes). En los casos de infección de alto riesgo, estas lesiones pueden presentar atipias y transformarse malignamente<sup>38</sup>.

La Infección del virus debe comenzar en las células basales de un epitelio diferenciador, de esta manera el genoma viral comienza la amplificación, luego se empaqueta, permitiendo la generación de nuevas partículas virales, el VPH infecta mayormente en micro heridas que le permiten alcanzar las células basales mitóticamente activas que eventualmente se dividirán y entrarán en el manto parabasal, experimentando diferenciación<sup>37</sup>.

La endocitosis es el ingreso del VPH a la célula, independiente de la clatrina, la caveolina, la balsa lipídica y la dinamina, de esta manera el virus se une al proteoglicano (HPSG) de heparán sulfato libre de células o al proteoglicano de heparán (Sdc), Sdc2 y Sdc4, unidos a la membrana celular. Se han identificado receptores de membrana celular, incluidos EGFR,  $\alpha$ 6-integrina, CD63 y CD151 tetraspanina, y anexina A2/S100A10 heterotetrámero (A2t), que son necesarios para la absorción del VPH<sup>37</sup>.

La transcripción del VPH es impulsada por p97 y p105, volviéndose parte de los genotipos de alto riesgo permitiendo la expresión de genes E6, E7, E1 y E2, necesarios para las primeras etapas de la amplificación del genoma viral, finalmente estas proteínas virales encontradas en la cápside. De esta manera el proceso de infección genera especies que serán reactivas de oxígeno, inestabilidad genómica y roturas de cadenas de ADN, beneficiando la integración del genoma viral en el genoma celular<sup>37</sup>.

## **Proteínas del Virus del Papiloma Humano**

### **Tempranas o no estructurales**

**E1:** Es una proteína principal para la replicación y transcripción del virus.

**E2:** Importante para la replicación, segregación de los genes y la encapsulación viral.

**E4:** Regula la expresión de genes tardíos, la maduración del virus y la salida de los viriones.

**E5:** Incita la inestabilidad de los cromosomas y en la evasión a la respuesta inmunitaria, al mismo tiempo transforma la proteína E6 a la E7.

**E6:** Contribuye a la inhibición de la apoptosis y la evasión de la respuesta inmunitaria.

**E7:** Afecta la expresión de genes en la fase S, de igual manera contribuye en la evasión de la respuesta inmunitaria<sup>39</sup>.

### **Estructurales o tardías**

**L1:** Esta es la proteína principal de la cápside ya que conforma el 95%, la misma que reconoce a los receptores de la célula huésped, de función inmunogénica.

**L2:** Constituye una parte menor de la cápside, su función está en la alianza e ingreso del virión a la célula y el transporte de esta al núcleo<sup>39</sup>.

## Diagnóstico

### Citología Cervical

La citología cervical o PAP TEST, es un procedimiento de tamizaje y diagnóstico de CACU, reside en la recolección de células encontradas en la ZT del cuello uterino, tratando de recoger y visualizar en el microscopio, después de la tinción de Papanicolau, en búsqueda de células superpuestas, parásitos y morfología anómala de las células<sup>40</sup>.

El diagnóstico se realiza, obteniendo con la espátula de madera de Ayre las células del exocérvix y con el cepillo cervical o citobrush las células del endocérvix, se extiende la muestra en un portaobjetos y se fija con alcohol etílico al 96% o citospray, y se colorea con tinción de PAP<sup>41</sup>.

### Tipos de Lesiones Citológicas

#### ASC-US

##### Características Citológicas:

- **Células Escamosas:** Leve aumento en el tamaño nuclear y la hiper cromasia.
- **Alteraciones Nucleares:** Anomalías nucleares sutiles que no son suficientes para clasificar la muestra como L-SIL o H-SIL (Anexo #1).
- **Citoplasma:** Normal o ligeramente alterado.
- **Relevancia Clínica:** Lesión indeterminada que puede ser causada por infecciones, inflamaciones o cambios benignos. Generalmente, se recomienda repetir la citología en 6-12 meses o realizar pruebas adicionales de VPH para determinar la presencia de tipos de alto riesgo<sup>42</sup>.

#### ASC-H

##### Características Citológicas:

- **Células Escamosas:** Mayor cantidad de células atípicas comparado con ASC-US.
- **Alteraciones Nucleares:** Anomalías nucleares más pronunciadas que en ASC-US, pero insuficientes para un diagnóstico definitivo de H-SIL (Anexo #2).
- **Citoplasma:** Puede mostrar características que sugieren displasia moderada a severa.
- **Relevancia Clínica:** Indica una mayor probabilidad de lesiones de alto grado (H-SIL). Necesita una evaluación colposcópica y biopsias adicionales para determinar la naturaleza exacta de las anomalías celulares<sup>42</sup>.

## L-SIL

### Características Citológicas:

- **Células Escamosas:** Presencia de células escamosas maduras y metaplásicas.
- **Alteraciones Nucleares:** Displasia leve, aumento del tamaño nuclear, hipercromasia y contornos nucleares irregulares (Anexo #3).
- **Citoplasma:** Cantidad abundante de citoplasma, a menudo con halos perinucleares (indicativos de infección por VPH).
- **Células Koilocíticas:** Frecuentes, caracterizadas por núcleos agrandados y vacuolización citoplasmática perinuclear.
- **Relevancia Clínica:** Indica una infección activa por el VPH y cambios celulares que, generalmente, se resuelven espontáneamente en la mayoría de los casos sin tratamiento<sup>42</sup>.

## H-SIL

### Características Citológicas:

- **Células Escamosas:** Más inmaduras y displásicas.
- **Alteraciones Nucleares:** Displasia moderada a severa, núcleos muy aumentados de tamaño, hipercromáticos y con irregularidades en la cromatina (Anexo #4).
- **Citoplasma:** Relativamente escaso en comparación con L-SIL, con un borde citoplasmático más denso.
- **Mitosis Atípicas:** Pueden estar presentes, indicando una actividad proliferativa elevada.
- **Relevancia Clínica:** Mayor riesgo de progresión a carcinoma in situ o cáncer invasivo. Requiere un seguimiento más cercano y, a menudo, tratamiento para prevenir el desarrollo de cáncer<sup>42</sup>.

## Resultados

Los resultados de la citología cervical se hacen mediante la nomenclatura de acuerdo con la OMS, el sistema de Bethesda, clasificación según NIC (41). Estas nomenclaturas ayudan para la interpretación de los cambios celulares existentes en las células, o lesiones existentes en el cuello cervicouterino, de esta manera se logra comprender los estadios encuentre la neoplasia cervicouterina<sup>41</sup>.

## **Manejo y Seguimiento**

- **L-SIL:** Repetir citología en 12 meses, pruebas de VPH y colposcopia si persisten los cambios.
- **H-SIL:** Colposcopia inmediata y posible tratamiento.
- **ASC-US:** Repetir citología en 6-12 meses o realizar pruebas de VPH.
- **ASC-H:** Colposcopia inmediata para evaluar la presencia de H-SIL o lesiones más graves<sup>43</sup>.

## **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (rt)-PCR**

Se crea a través de una modificación del PCR, de esta manera el PCR es un proceso enzimático utilizado in vitro para la amplificación de una región de ADN seleccionada a través de varios órdenes de magnitud, generando de miles a un sinnúmero de copias de una porción específica, para la realización de esta técnica se necesita un ADN molde del virus, cebadores, nucleótidos (dNTP) y ADN polimerasa termoestable<sup>44</sup>.

## **Fundamento de la prueba**

El diagnóstico del ADN del VPH se realiza mediante fluorescencia por PCR, esta detectará 23 genotipos de PCR (tipo 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 81, 82) los mismos que están presentes en células exfoliadas del cuello uterino<sup>45</sup>. La tecnología Tacman, mediante fluorescencia por PCR, ha creado un kit diagnóstico (Anexo #5).

En el kit diagnóstico indica la utilización de pares de cebadores específicos y sondas de fluorescencia específicas de los 23 tipos de ADN del VPH mencionados anteriormente para probar los diferentes fragmentos de ADN específicos de 23 tipos de ADN del VPH para el genotipado dividiéndose en 6 tubos de reacción. Este sistema utiliza una prueba con la enzima UNG + dUTP para degradar completamente los posibles productos amplificados por PCR con el fin de evitar un resultado falso positivo<sup>45</sup>.

## **Toma de muestra para PCR en Tiempo Real mediante Fluorescencia**

La toma de muestra cervical se debe realizar por medio de un cepillado o biopsia, dependiendo de la localización, en el cepillado, se usa un cepillo desechable o citobrush que sea específicamente diseñado, no puede ser de algodón, ni de madera, ya que puede inhibir

la PCR<sup>46</sup>. Se debe recoger las células del canal endocervical, introduciendo las dos terceras partes del tubo endocervical, se rota suavemente en dirección de las agujas del reloj, si hay secreción excesiva se limpia con un hisopo de algodón en la abertura cervical, luego se coloca el cepillo en un tubo de recogida de muestra estéril, que contenga reactivos de almacenamiento de la muestra<sup>45-46</sup>.

### **Extracción del ADN de VPH**

Para la extracción del ADN de VPH, se realiza la preparación de los reactivos a usar<sup>45</sup>.

El kit diagnóstico de fluorescencia por PCR por la tecnología de Tacman menciona que:

1. Se debe mezclar 6 tipos de VPH-PCR (nx38 µl) respectivamente con la mezcla de enzimas del genotipo del VPH (6n × 2 µl) (n = número de muestras + 2 controles de calidad)<sup>45</sup>.
2. Al mezclarlos completamente se hace un PCR-Mastermix. Centrifuga a 2000 rpm durante 10 segundos y guárdalo a 2-8 °C para su uso posterior<sup>45</sup>.
3. **Control negativo** Pipetear 1 ml de eluyente de la muestra del tubo de recogida de muestras en un tubo esterilizado de 1,5 ml<sup>45</sup>.

Existen dos métodos de procesamiento para la extracción del ADN de VPH

1. Se usa el reactivo de liberación de muestras (S1013E) fabricado por Sansure Biotech Inc. para la extracción de ácido nucleico<sup>45</sup>.
2. Usar el kit de extracción y purificación de ácido nucleico (S10016E) fabricado por Sansure Biotech Inc. para la extracción de ácido nucleico (Anexo #6)<sup>45</sup>.

### **Procedimiento**

#### **Toma de muestra para (rt)PCR:**

1. Realizar el cepillado o biopsia con un cepillo desechable o citobrush.
  - Introducir 2/3 del cepillo en el canal endocervical.
  - Girar suavemente el citobrush en círculos.
  - Si existe secreción excesiva, limpiar con un hisopo de algodón en la abertura cervical.
2. Colocar el citobrush en un tubo de recogida de muestra estéril que contenga reactivos de almacenamiento.

#### **Procesamiento de muestra:**

1. Almacenar la muestra en refrigeración.
2. Atemperar la muestra en el área de biología molecular antes del procesamiento.

3. Cargar las muestras en la región de procesamiento de muestras:
  - Preparar y cargar 10 µl de ácido nucleico de las muestras y el control del genotipo negativo del VPH en 6 tubos de reacción de PCR.
4. Preparar los controles:
  - Cargar 10 µl del control positivo del genotipo del VPH en el tubo de reacción de PCR. Repetir este paso 6 veces.
  - Colocar el cepillo en el tubo de reacción, evitando obtener impurezas. Repetir este paso 6 veces.
5. Agregar 40 µl de los 6 tipos de VPH PCR-Mastermix preparados anteriormente en 6 tubos de reacción de PCR.
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 segundos o agitar suavemente hasta que no haya gotas en la pared del tubo.
7. Colocar los 6 tubos de reacción en el equipo Termociclador Bioer LineGene MiniS.

#### **Amplificación del ADN en el termociclador:**

1. Primer ciclo: 50°C por 2 minutos para la reacción de la enzima UNG.
2. Segundo ciclo: 94°C por 5 minutos para la activación de la enzima Taq.
3. Desnaturalización: 94°C por 15 segundos durante 45 ciclos.
4. Recogido, extensión y recolección de señales de fluorescencia: 57°C por 30 segundos durante 45 ciclos (Anexo #7)<sup>45</sup>.

#### **Resultados:**

1. Utilizar las secuencias genómicas generadas para diseñar primers y sondas Taqman.
2. El equipo termociclador genera frecuencias para cada tipo de carga viral, diferenciando los tipos de VPH.
3. Una vez identificado el genotipo de cada paciente, los resultados son entregados de manera electrónica.

#### **Primers y sondas diseñadas para genotipificación de VPH**

Los primers son diseñados a partir de codones presentes en los tipos de VPH, se han tomado entre 18 a 24 pares de bases y una temperatura de melting o temperatura de fusión del ADN de 58 a 61, al igual que el primer de avance tendrá una cadena que sintetiza de 5' a 3' y el primer de reversa de 3' a 5', para la amplificación o fragmentación del ADN, por el método de PCR en Tiempo Real mediante Fluorescencia<sup>47-48</sup>.

Las secuencias genómicas han sido obtenidas de National Center for Biotechnology Information, U. S (NCBI), procesándose en base a las situaciones de reacción del PCR en Tiempo Real mediante Fluorescencia, al igual que, se tomó en cuenta el diseño del equipo Tacman<sup>49</sup>, de esta manera se considera una mayor especificidad y eficiencia.

### **Resultados**

Se revisa las sondas y primer a través de graficas que se generan en un PC con software diseñado específicamente para la cuantificación genética<sup>45</sup>.

### **Tratamiento**

Se evalúa aisladamente a cada paciente, pero por lo regular se utiliza la crioterapia en dónde se emplea directamente nitrógeno líquido gaseoso o criosonda en la lesión<sup>50</sup>. Además, actualmente se han desarrollado estudios, que indican que el tratamiento con *Lactobacillus crispatus*, ayuda a crear y mantener una barrera que inhibe la entrada del VPH al epitelio cervical por lo que de igual forma se está utilizando como un tratamiento alternativo, pero sin embargo no erradica la presencia de este virus<sup>51</sup>.

### **Prevención**

La prevención por medio de la vacunación es una forma efectiva a largo plazo para evitar la morbilidad y mortalidad por la infección de VPH. Las vacunas aprobadas por el momento son Cervarix®, Gardasil® y Gardasil9® los esquemas de vacunación son dirigidos principalmente a niñas entre la edad de 9 y 13 años, en algunos países también se ha incentivado a que los niños empiecen a ser vacunados de igual manera<sup>52</sup>.

## CAPÍTULO III. METODOLOGIA

### **Tipo de Investigación**

**Según su enfoque fue cuantitativo**, porque se fundamentó en gran parte en análisis estadísticos y se tomó datos cuantitativos obtenidos durante la investigación.

**Según el nivel fue descriptiva**, porque se analizaron los fenómenos observados y se especificaron características, clasificación y factores de riesgo del VPH, además se detallaron tendencias de un grupo o población en específico en este caso estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo.

**Según el diseño fue de campo y no experimental**, debido a que se realizaron en el lugar donde ocurrieron los hechos, es decir en las instalaciones de la Universidad Nacional de Chimborazo con estudiantes de las carreras de la Facultad de Ciencias de la Salud, donde las muestras obtenidas se analizaron en el laboratorio de Biología Molecular, y no experimental, porque no se vio la necesidad de manipular variables de estudio basándose en la compilación, análisis e interpretación de datos obtenidos a partir de los resultados de citología cervical.

**Según la secuencia temporal fue de cohorte transversal**, debido a que el estudio se realizó en un periodo de tiempo determinado, es decir, octubre de 2023 a febrero de 2024, con una sola medición donde se seleccionó información relevante para su posterior análisis y seguimiento, presentándose en un solo bloque de resultados sin grupos controles.

**Según la cronología de los hechos fue de tipo retrospectivo**, debido a que partió de los resultados obtenidos de las diferentes muestras que fueron analizadas y evaluadas mediante la técnica de biología molecular.

**Técnicas de Recolección de Datos**, se utilizó como método de recolección de datos, encuestas dirigidas hacia las estudiantes que formaron parte de la investigación las cuales pertenecen a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo, además para el procesamiento de datos se utilizó la aplicación Excel y una plataforma de software IBM SPSS para análisis estadístico.

## **Población**

La población fue conformada por 1939 mujeres de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo en el periodo 2023-2S, las mismas pertenecientes a las carreras de Medicina, Enfermería, Laboratorio Clínico, Fisioterapia, Odontología y Psicología Clínica, los datos fueron obtenidos del Sistema Informático de Control Académico (SICOA) (Anexo #8).

## **Muestra**

De acuerdo al cálculo para una población finita la muestra fue de 129 mujeres, de la misma se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia en donde se aplicó métodos de selección, excluyendo a mujeres que no desearon realizarse el PAP Test, se encontraban menstruando o no han iniciado una vida sexual e incluyendo a quienes se realizaron un PAP test por primera vez o presentaban cambios citológicos anteriormente, obteniendo un total de 124 mujeres pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo, de estas resultaron con lesiones citológicas 30 estudiantes, no obstante 3 de ellas no aprobaron realizarse la genotipificación de VPH, obteniendo 27 pacientes para el análisis.

## **Muestreo para genotipificación**

El tipo de muestreo que se realizó fue no probabilístico por conveniencia, debido a que la muestra fue seleccionada a partir de pacientes con resultado positivo a diferentes grados de lesiones cervicales como ASC-US, ASC-H, L-SIL y H-SIL siendo un total de 27 estudiantes pertenecientes a las disímiles carreras de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo de las cuales 19 estudiantes obtuvieron un resultado positivo para Virus del Papiloma Humano.

## **Consideraciones Éticas**

El proyecto de investigación "Relación de las características genotípicas del VPH más frecuentes y las variables epidemiológicas encontradas en las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud periodo 2023-2S." del que se deriva este trabajo de titulación, ha sido aprobado por el comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Universidad Central de Ecuador con el código 0004-EXT-2021 (Anexo #9).

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el actual apartado se ejecutó el análisis de los datos obtenidos en la muestra estudiada conformada por 27 estudiantes universitarias de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo.

En la (Tabla 2) se presenta la prevalencia de los genotipos de VPH, distinguiendo entre resultados positivos y negativos en una población específica. Los datos recopilados son fundamentales para entender la distribución de los diferentes genotipos de VPH.

**Tabla 2:** Resultados positivos y negativos para VPH.

### Comparación de resultados Positivos y Negativos de Genotipificación HPV

	Frecuencia	Porcentaje
Positivo	19	70.4
Negativo	8	29.6
Total	27	100.0

La tabla proporcionada muestra que existe un mayor índice de casos positivos para VPH tanto de alto y bajo riesgo donde el 70,4% del total de pacientes dieron un resultado positivo mientras que el 26,9% obtuvo un resultado negativo. Este alto porcentaje de positividad destaca la importancia de una vigilancia continua y de programas de prevención eficaces, contra el VPH.

Clifford et al<sup>53</sup>, en su estudio titulado “Prevalence and Genotype Distribution of Human Papillomavirus in Women with Abnormal Cervical Cytology in North America”, publicado en *Journal of Clinical Virology*, encontraron una prevalencia similar del VPH en mujeres con citología anormal en América del Norte. Este estudio indicó que los genotipos de mayor riesgo, como el VPH 16 y 18, eran los más comunes en esta población. Esto es consistente con nuestros hallazgos, donde una alta proporción de las pacientes dieron positivo para el VPH.

A su vez Castle et al<sup>54</sup>, en su estudio “Clinical Outcomes of ASC-H Cytology: A Multi-Institutional Study”, publicado en *Cancer Cytopathology*, encontraron que las mujeres con

ASC-H y H-SIL tienen una mayor probabilidad de estar contagiadas por VPH. Este hallazgo concuerda con nuestra investigación debido a que la muestra estudiada fue conformada por pacientes con lesiones citológicas como ASC-H, ASC-US, L-SIL Y H-SIL.

La alta prevalencia de resultados positivos de VPH observada en nuestra tabla coincide con los hallazgos de investigaciones recientes. Los estudios revisados enfatizan la importancia de la genotipificación, cribado y vacunación en la lucha contra el VPH. La implementación de tácticas de prevención y manejo son fundamentales para comprimir la carga de enfermedades afines con el VPH y mejorar los resultados de salud a largo plazo.

En la (Tabla 3) se presenta la prevalencia de los genotipos de alto riesgo en un conjunto de habitantes específico, destacando la prevalencia de cada genotipo. La información contenida en esta tabla es crucial para entender la distribución y frecuencia de estos genotipos.

**Tabla 3.** Prevalencia de Genotipos de VPH de Alto Riesgo.

<b>Genotipo de Alto Riesgo</b>		
	Frecuencia	Porcentaje
VPH 16	1	2.5
VPH 18	4	10.0
VPH 26	1	2.5
VPH 31	5	12.5
VPH 33	4	10.0
VPH 35	3	7.5
VPH 39	2	5.0
VPH 45	1	2.5
VPH 51	1	2.5
VPH 52	2	5.0
VPH 53	1	2.5
VPH 56	3	7.5
VPH 58	4	10.0
VPH 59	1	2.5
VPH 66	3	7.5
VPH 68	1	2.5
VPH 73	2	5.0
VPH 82	1	2.5
Total	40	100.0

Se puede evidenciar en los resultados de la genotipificación realizada que existen un alto índice de genotipos de alto riesgo, donde el genotipo 31 del HPV una prevalencia del 12,50% seguido del genotipo 18, 33, 58 con una prevalencia del 10%, siendo estos los que presentaron mayor prevalencia, donde el análisis molecular del VPH identifica los diferentes genotipos presentes en la muestra estudiada y se pueden clasificar según su grado oncológico.

Rodríguez et al<sup>55</sup>, en su artículo “Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real” menciona que el uso de tecnología fluorescente permite que la rapidez con la que la señal fluorescente alcanza un umbral específico sea un indicador de la cantidad inicial del fragmento amplificado, facilitando así su cuantificación. En la investigación realizada se verifica, que la amplificación de la muestra por medio de la (rt)PCR logró identificar 18 genotipos de alto riesgo incluyendo los de grado oncológico como el genotipo 16 y 18, al tratarse de una técnica cuantitativa con mayor sensibilidad.

De esta manera se evidenció en la investigación realizada, debido a que se utilizó la PCR en tiempo real con fluorescencia lo que proporcionó resultados confiables y nos permitió determinar 18 diferentes genotipos de alto grado y clasificarlos según su grado oncológico en el caso de nuestra investigación se pudo determinar que existe mayor prevalencia del genotipo 31 con el 12,50%.

Bonifaz et al<sup>49</sup>, en su estudio " Identificación Molecular de los VPH Oncogénicos Mediante PCR en Tiempo Real con Sondas Taqman" se utilizaron técnicas de PCR en tiempo real con fluorescencia para identificar genotipos de VPH en una población femenina, los resultados mostraron que el genotipo más frecuente fue el VPH 16 con una frecuencia de 24.4% al contrario de nuestra investigación en dónde la frecuencia del VPH 16 fue del 2.5% y el genotipo con mayor frecuencia fue el genotipo 31 con el 12,50%. Esta diferencia significativa sugiere una alta variabilidad en la prevalencia de VPH 16 en diferentes poblaciones y tipos de muestras.

En el estudio y en la investigación de Bonifaz et al<sup>49</sup>, se identifican una variedad de genotipos de alto riesgo, lo que refleja la diversidad genética del VPH y la importancia de realizar una

genotipificación amplia para la detección y prevención efectivas, además, ambos estudios utilizan PCR en tiempo real, garantizando precisión y rapidez en la detección de genotipos de VPH. Sin embargo, las diferencias en la prevalencia pueden deberse a variaciones en las características de la muestra y la población estudiada, más no de la técnica utilizada en la investigación.

En la (Tabla 4) se enseña la prevalencia de genotipos de bajo riesgo; la información contenida en esta tabla es esencial como una base para la consumación de programas de prevención y tratamiento, además, los genotipos considerados de bajo riesgo en esta tabla incluyen, pero no se limitan a los genotipos 6 y 11, sino que también incluye los genotipos 42, 43 y 81, proporcionando un panorama completo de la prevalencia de estos patógenos en la población estudiada.

**Tabla 4:** Prevalencia de Genotipos de VPH de bajo riesgo

#### **Genotipos de VPH de Bajo Riesgo**

	Frecuencia	Porcentaje
VPH 6	0	0
VPH 11	1	16.7
VPH 42	2	33.3
VPH 43	3	50
VPH 81	0	0
Total	6	100

Se puede evidenciar en los datos proporcionado que los resultados de la genotipificación realizada existen un menor índice de genotipos de bajo riesgo en la muestra estudiada, donde el genotipo 43 presenta una prevalencia del 50%, seguido del genotipo 42 con 33,3%, mientras que el genotipo 11 presenta una prevalencia del 16,67%. Finalmente, los genotipos 6 y 81 no presentaron prevalencia en la investigación realizada.

El análisis molecular del VPH identifica los diferentes genotipos presentes en la muestra estudiada y se pueden clasificar según su grado oncológico en el caso de los genotipos de bajo riesgo causan una infección clínicamente visible denominada verrugas o condilomas. Un estudio de Serretiello et al<sup>56</sup>, “Prevalence and Distribution of High- and Low- Risk HPV Genotypes in Women Living in the Metropolitan Area of Naples: A Recent Update”

encontró que el VPH 6 era el más común en lesiones benignas con una frecuencia del 8,6%, a diferencia de nuestra investigación en donde el genotipo 6 no presentó ningún valor, a diferencia del genotipo 43 que presentó una prevalencia del 50% en la muestra estudiada.

Bonifaz et al<sup>49</sup>, en su estudio " Identificación Molecular de los VPH Oncogénicos Mediante PCR en Tiempo Real con Sondas Taqman" determinó que la técnica utilizada es cuantitativa con mayor sensibilidad lo que nos permite determinar con mayor exactitud que genotipos se encuentran presentes en cada muestra analizada. Lo cual fue evidenciado en la investigación, donde se utilizó la misma técnica que permitió identificar 5 genotipos de bajo riesgo de los cuales en nuestra investigación el más común fue el genotipo 43 con el 50%, mientras que los genotipos 6 y 81 no presentaron ningún porcentaje.

En la (Tabla 5 y Tabla 6) se enseña un balance entre los resultados de citología y genotipificación de VPH en una población específica, distinguiendo entre resultados positivos y negativos para genotipos de alto y bajo riesgo, la información contenida en esta tabla es crucial para evaluar la concordancia y la efectividad de cada método en la detección de la infección por VPH.

**Tabla 5.** Número de casos positivos para genotipos de alto de riesgo según la lesión cervical

### Positivos para Genotipos de Alto Riesgo

	Frecuencia	Porcentaje
ASC-US	11	40.7
L-SIL	6	22.2
ASC-H	1	3.7
H-SIL	1	3.7
Resultado Negativo	8	29.6
Total	27	100.0

En la tabla presentada se observa una mayor de prevalencia de casos positivos para genotipos de alto riesgo oncológico en las pacientes que presentan ASC-US con un 40,7% seguido de pacientes con L-SIL con un 22,22%, pero en la misma tabla se puede apreciar que el 29,63% se trataron de pacientes con cambios morfológicos en la citología, pero resultados negativos para VPH.

En la investigación realizada por Castle et al<sup>54</sup>, indicó que las atipias celulares leves (ASC-US y L-SIL) son las presentaciones citológicas más comunes en féminas con infecciones por VPH de alto riesgo. En comparación con el presente estudio, los resultados coinciden en que ASC-US representa el mayor porcentaje de casos siendo 40,74%.

La distribución de los resultados citológicos en la localización de genotipos de alto riesgo del VPH muestra una notable variabilidad, con un predominio de casos en lesiones de bajo grado como ASC-US, H-SIL y una menor frecuencia de lesiones de alto grado como ASC-H y H-SIL. Este patrón es consistente con estudios previos que han observado que la gran parte de infecciones por VPH de alto grado inicialmente producen cambios celulares leves antes de progresar a lesiones más graves.

**Tabla 6.** Número de casos positivos para genotipos de bajo riesgo según la lesión cervical

**Positivos para Genotipos de Bajo  
Riesgo**

	Frecuencia	Porcentaje
ASC-US	1	3.7
L-SIL	2	7.4
ASC-H	1	3.7
H-SIL	1	3.7
Resultado Negativo	22	81.5
Total	27	100.0

Los pacientes que presentaron un L-SIL representan un 7,41% de casos positivos para genotipos de bajo riesgo, seguido de las demás lesiones citológicas con un 3,70% cada una de ellas, al contrario, los resultados negativos para genotipos de bajo riesgo fueron del 81,48% del total de pacientes por lo que se podría decir que la mayoría de las pacientes no presentan resultados positivos para genotipos de bajo grado, como se observa en la tabla 7.

Mendoza et al<sup>57</sup>, corrobora que el diagnóstico molecular de VPH y la relación con las lesiones cervicales de bajo grado puede ser variable en las evoluciones de estas, en cambio en la investigación de Sequera et al<sup>58</sup>, indica que la mayoría de las pacientes en edades de 18-25 años que presentaron genotipos de bajo grado de VPH, presentaban ASC- US, lo cual contrasta con la investigación, ya que las pacientes en estudio presentan un L-SIL, por tanto, se puede aludir que esta diferencia puede deberse al grupo de acompañantes sexuales de las pacientes.

La realización de citología cervical y PCR en tiempo real para VPH como lo manifiestan Sequera et al<sup>58</sup> y Mendoza et al<sup>57</sup>, ayuda a una mejor detección y sensibilidad de casi el 100% en los tipos de Virus de VPH.

Estos hallazgos resaltan la importancia de utilizar una combinación de métodos de detección, como la citología y la genotipificación, para una evaluación más completa y precisa del riesgo de VPH en la población. Además, la estratificación de los resultados por categorías citológicas específicas permite una alta comprensión del ascenso de la enfermedad y una gestión más efectiva de los casos de alto riesgo.

En la (Tabla 7) se muestra la prevalencia de los genotipos de VPH en una población específica, distinguiendo entre resultados positivos y negativos, y analizando la influencia del compilado de compañeros sexuales y la edad de la primera relación sexual como factores predisponentes. La información contenida en esta tabla es crucial para comprender cómo la exposición a varias parejas sexuales y el inicio de una vida sexual muy corta edad puede afectar la prevalencia de distintos genotipos del virus.

**Tabla 7:** Factores predisponentes para el contagio de VPH

<b>Factores Predisponentes para el contagio de VPH</b>					
<b>Número de compañeros sexuales</b>		<b>Edad de la primera Relación Sexual</b>			
	Frecuencia	Porcentaje		Frecuencia	Porcentaje
1	5	26.3	<15	1	5.3
2	3	15.8	16-18	10	52.6
3	6	31.6	>18	8	42.1
>3	5	26.3			
Total	19	100.0	Total	19	100.0

Para el análisis del número de compañeros sexuales, se tuvo en cuenta 19 muestras de las 27 analizadas. Estas 19 son las muestras positivas para genotipificación de VPH. Donde se observa que las pacientes que tienen uno y más de tres compañeros sexuales representa un 26.32%, pero existe un porcentaje del 31,58% que representa a quienes han tenido 3 compañeros sexuales, es decir, los compañeros sexuales es un factor predisponente, en la adquisición del Virus del Papiloma Humano, cada nueva pareja sexual aumenta la probabilidad de exposición al virus tanto de la paciente como del compañero sexual.

Mientras que dentro de la edad de la primera relación sexual existe una prevalencia de 52,63% de pacientes que tuvieron su primera relación sexual entre las edades de 16 a 18 años, mientras que un 42,11% su primera relación sexual fue siendo mayor de 18 años, y en un menor porcentaje 5,26% siendo menores de 15 años. La edad de iniciación de la acción sexual está asociada como un factor predisponente para contraer el VPH, al tener una exposición previa al virus y las pacientes pueden hacerse más susceptibles a la infección.

Los principales causas para la inoculación por VPH en féminas están influenciados principalmente por la actividad sexual, esto menciona Vilema et al<sup>59</sup>, el mismo que se ve afectado especialmente por la conducta sexual de la pareja influye, aunque la infección por VPH se distingue de otras infecciones de transmisión sexual (ITS) porque puede ocurrir incluso sin que haya penetración durante el acto sexual, por otro lado, en la investigación de Salazar et al<sup>60</sup>, se observó que hay una mayor prevalencia en las mujeres con numerosos

compañeros sexuales que en las mujeres con solo una. Encontrándose una relación significativa entre la cantidad de compañeros sexuales y la inoculación del VPH.

En la investigación realizada se pudo establecer que las pacientes con más de 3 parejas sexuales representan casos positivos, tanto en la citología como en la genotipificación por medio de PCR en tiempo real con fluorescencia tanto para genotipos de alto y bajo grado.

Además, Medina et al<sup>4</sup>, explican que la iniciación de la sexualidad con otras personas a edad temprana, es decir, menor de 14 años, compone uno de los primordiales riesgos, motivando a direcciones riesgosas, acompañado con la reducida protección de que las parejas llegaran a estar contagiadas, aumentando los riesgos de transmisión sexual, de la misma manera, Malave et al<sup>61</sup>, corroboran y mencionan que la actividad sexual puede ser un factor de riesgo evitable en el cual se deben estructurar medidas de prevención.

Por tanto, se puede observar este comportamiento en la población estudiada, debido a que la generalidad de las pacientes comenzó su vida sexual entre los 16 y 18 años que representa 55,6% y de las mismas, la mayoría presentó lesiones cervicales en la citología cervical, así como un resultado positivo en biología molecular, demostrando que al iniciar una vida sexual a muy temprana edad puede contribuir al riesgo de contraer VPH.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- En relación con los genotipos de VPH de alto riesgo analizados por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se estableció que el genotipo 18 presenta una prevalencia del 10.0% seguido del genotipo 31 con el 12,5% existiendo mayor índice de afectación en mujeres mayores de 18 años, mientras que dentro de los genotipos de bajo riesgo el genotipo 43 presenta una prevalencia del 50%, seguido del genotipo 42 con 33,3% afectando a mujeres entre 20 a 25 años en la muestra estudiada.
- El principal diagnóstico presuntivo de la citología cervicovaginal, fue ASC-US, ASCH, H- SIL y L-SIL, los mismos que se relacionaron con los resultados del análisis de la técnica de PCR, para identificar los genotipos de alto y bajo riesgo de VPH como prueba confirmatoria para el diagnóstico final y la detección temprana del virus, con resultados positivos de genotipificación un 70.4% y un 29.6% de resultados negativos, es decir, el diagnóstico por citología cervicovaginal de VPH no es definitivo.
- Los diferentes factores predisponentes que están asociados a la existencia de genotipos de alto riesgo oncológico, identificados en el formulario, fueron los antecedentes sexuales como la edad de la primera relación sexual con un 52,63% de las pacientes inició su actividad sexual entre los 16 y 18 años, además se tomó en cuenta el número de parejas sexuales en donde el 26,3% tuvo más de 3 compañeros sexuales lo cual también está asociado como otro factor de riesgo, de esta manera se da a conocer que el formulario facilita a la identificación de grupos de riesgo, al mismo tiempo ayuda a conocer cuáles pueden ser las medidas preventivas adecuadas para la población de estudiantes, para una detección temprana y un tratamiento adecuado.

## **Recomendaciones**

Tras analizar los resultados del estudio, se proponen las siguientes recomendaciones para minimizar los factores de riesgo asociados con la transmisión del Virus del Papiloma Humano:

- Impulsar a que todos los estudiantes que forman parte de la Facultad de Ciencias de Salud asuman la importancia de la enfermedad y buscar estrategias para brindar toda la información necesaria sobre el tema incentivando a charlas en cada una de las carreras de la Universidad Nacional de Chimborazo.
- El Rector y los Docentes de la Universidad Nacional de Chimborazo es esencial que tengan un conocimiento adecuado sobre las enfermedades de transmisión sexual, incluido el Virus del Papiloma Humano. evitando que los temas se conviertan en tabú y lograr que se puedan tratar ampliamente en cada carrera.
- Motivar a los estudiantes que muestren síntomas del virus para que visiten los centros de salud y reciban el tratamiento correspondiente, al mismo tiempo que se fomente en toda la comunidad el conocimiento sobre la enfermedad. Esto permitirá que se conviertan en voceros en otras comunidades sobre las implicaciones del VPH, incluyendo el riesgo de desarrollar diferentes carcinomas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Prado J, Hernández I, Ruvalcaba J, et.al. VPH: Generalidades, prevención y vacunación. Proeditio. 2021 Febrero; VI(2).
2. Chávez R, Anaxímenes L, Rodríguez E. Genotificación del virus del papiloma humano en pacientes femeninas atendidas en un hospital oncológico del Ecuador. Radieluz. 2020 2021; X(2).
3. Urdaneta Machado J, Baabel Zambrano N, Maggiolo I, Contretas Benitez A. Genotipificación del Virus del Papiloma Humano en mujeres en edad reproductiva del estado Zulia, Venezuela. Vitae: Academia Biomédica Digital. 2019 Septiembre;(77).
4. Medina L, Merino L. Principales conductas de riesgo sobre Papilomavirus Humano en universitarios argentinos. Avances en Odontoestomatología. 2018 Noviembre; XXXIV(6).
5. Perez Perez , Tedesco , Gonzalezz , Lopez Jordi , Rey. Prevalencia de los genotipos de HPV en lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino en la población del Hospital de Clínicas. Montevideo-Uruguay. Anales de la Facultad de medicina. 2020 Diciembre.
6. Organización Mundial de la Salud. Papilomavirus humano y cáncer. [Online].; 2024 [cited 2024 Mayo 20. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer>.
7. Murillo A, Morales M, Quimiz M. Virus del papiloma humano: una actualización al diagnóstico y la prevención. Dom. Cien. 2022 Abril; VIII(2).
8. Nogueira A. HPV Vaccination in Latin America: Global Challenges and Feasible Solutions. Cancer Prevention, Hereditary Genetics, and Epidemiology. 2019; XXXIX(39).
9. Aguiar H, González F, Pacheco C, Correia H, Herrera F. Distribución de genotipos del virus de papiloma humano en mujeres del edo. Rev Obstet Ginecol Venez. 2018; LXXVIII(1).
10. Ramos A. Prevalencia de la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y posibles factores de riesgo en pacientes diagnosticados con cáncer de orofaringe de tres países de América del Sur. [Online].; 2023 [cited 2024 Junio 4. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/85662/1110525325.2023.pdf?sequ>.

11. Yuxi Bustos J, Gallegos Vintimilla S. Prevalencia de serotipos del virus de papiloma humano en mujeres de Ecuador. *Vive Revista de salud*. 2021 Agosto.
12. Vega Crespo B, Neira Molina V, Flores Salinas M, Guerra Astudillo G, Mora Bravo L, Ortiz Segarra J. Situación actual del cáncer de cuello uterino en Ecuador, 2019. [Online].; 2020 [cited 2024 Mayo 19. Available from: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiWl-jZj52GAxV3gYQIHbjADCEQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2Ffi-admin.bvsalud.org%2Fdocument%2Fview%2F5na3e&usg=AOvVaw1w9THwSzxstTP-RwmabcQ&opi=89978449>.
13. Págalos A, Ramírez J. Incidencia del Cáncer cervicouterino en mujeres de 25 a 45 años con HPV, atendidas en el IESS-Riobamba, 2016-2018. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba. Ecuador.[Tesis de Pregrado]. 2019.
14. Alarcón P, Ramírez J, Págalos A. Incidencia de Cancer Cervicouterino en mujeres de 25 a 45 años con HPV, atendidas en el IESS Riobamba, 2016-2018. Universidad Nacional de Chimborazo; 2019.
15. Ministerio de Salud Pública. Protocolo Cáncer Cervicouterino. 2018.
16. Boguñá N, Capdevila L, Jané E. El virus del papiloma humano y su relación con la patología de la cavidad oral. *Medicina Clínica*. 2019 Agosto; CLIII(4).
17. Sendagorta E, Burgos J, Rodríguez M. Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019 Mayo; XXXVII(5).
18. Smalley C, Roller N, Troy S, Schlom J. Therapeutic Vaccines for HPV-Associated Malignancies. *ImmunoTargets and Therapy*. 2022;(9).
19. Boguñá N, Capdevila L, Jané-Salas E. El virus del papiloma humano y su relación con la patología de la cavidad oral. *Medicina Clínica*. 2019; CLIII(4).
20. Román C, Merchán M, Andrade D, et.al. Virus de Papiloma Humano, cáncer cervicouterino y modificaciones epigenéticas. *Revista Estudiantil CEUS*. 2019; I(2).
21. Besa M, Agustí C, Roca C, et.al. Manejo en atención primaria de las infecciones de transmisión sexual (I). *Epidemiología. Síndrome secretor*. Abril. 2023 Mayo; LV(5).
22. Serrano L, López A, Cortés J. *Virus del Papiloma Humano Casos Prácticos*. Segunda ed. Madrid: SANED; 2020.

23. Oyouni A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *Journal of Infection and Public Health*. 2023 Abril; XVI(4).
24. Oyouni A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *J Infect Public Health*. 2023; XVI(4).
25. Cárdenas A, Campuzano B, Paredes J, et.al. Virus del papiloma humano y su relación con el cáncer de cérvix. *Recimundo*. 2022 Enero; VI(2).
26. Hernández J, Valero J, Ramírez M. Prevención primaria del virus del papiloma humano. *Revista Oficial de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*. 2019 Marzo; LXII(3).
27. Hernández J, Fuente J, Ramírez M. Prevención primaria del virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol*. 2019; LXII(3).
28. Sendagorta E, Burgos J, Rodríguez M. Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019; XXXVII(5).
29. Combes J, Franceschi S. Human papillomavirus genome variants and head and neck cancers: a perspective. *Infect Agent Cancer*. 2018 Abril; X(13).
30. Casseb T, Pereira D. Uma revisão sobre a patogenia, aspectos imunológicos e tratamentos do HPV. *Brazilian Journal of Health Review*. 2022 Octubre; V(5).
31. Espinosa L, Clara N, García J. Cáncer de cuello uterino y el papiloma humano. *Neutrosophic Computing and Machine Learning*. 2021; XVII.
32. Pérez N, Tedesco S, González F, et.al. Prevalencia de los genotipos de HPV en lesiones pre invasoras de alto grado de malignidad y cáncer de cuello uterino en la población del Hospital de Clínicas. Montevideo: Universidad de la República de Uruguay, Facultad de Medicina; 2020.
33. Bendezu G, Soriano A, Urrunaga D, et.al. Asociación entre conocimientos acerca del cáncer de cuello uterino y realizarse una prueba de Papanicolaou en mujeres peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020 ; XXXVII(1).
34. Damian M, Soxo R, Cazar M. Infección por el virus del papiloma humano y cáncer de cuello uterino. *Pol. Con*. 2022; VII(6).
35. Guerrero G, Encalada G, Arias I, et.al. Mortalidad del cáncer de cuello uterino en mujeres de 20 a 50 años en el ecuador. *Salud y Bienestar Colectivo*. 2021; V(5).

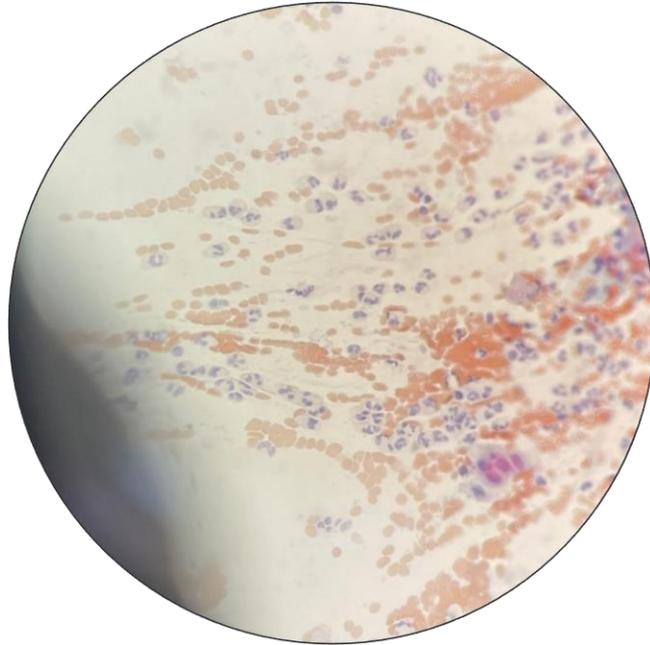
36. Prado Peláez J, Hernández Pacheco I, Ruvalcaba Ledezma J, Ceruelos Hernández MdC. VPH: generalidades, prevención y vacunación. *Journal of Negative and No Positive Results*. 2021 Febrero; 6(2).
37. Muñoz Bello O, Carrillo García A, Lizano M. Epidemiología y Biología Molecular de las Variantes del VPH en el Cáncer de Cuello Uterino: Estado del Arte en México. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*. 2022 Agosto; 23(15).
38. Luria L, Cardoza Favarato G. Virus del Papiloma Humano. In: StatPearls, National Library of Medicine. 2023 Enero.
39. Nuñez J. Epidemiología del virus del papiloma humano. *Investigación Clínica*. 2022 Junio; LXIII(2).
40. Beltrán L, García R, Andrade V, et.al. Comparación del Papanicolau con técnica convencional frente a técnica modificada. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2022 Enero; LX(2).
41. Naranjo I, Cuzco A, Quinteros A, et.al. Citología cervical: condiciones técnicas de una toma correcta e interpretación. *La Ciencia al Servicio de la Salud y la Nutrición*. 2019 Julio; X.
42. Perkin R, et.al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2020 Abril; XXIV(2).
43. Massad L, et.al. Clinical Management Guidelines for Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2019.
44. Artika H, Permata Dewi Y, Margaretha Nainggolan I, Siregar J, Antonjaya U. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real: técnicas actuales, aplicaciones y papel en el diagnóstico. *Genes (Basilea)*. 2022 Diciembre; 13(12).
45. Biotech S, inventor; Biotech S, assignee. Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing). *Indonseia*. 2020 Agosto 10.
46. Lidemann M, Perez S, Perez M, Rodríguez M. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2016.
47. Green M, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019.

48. Díaz Ferreira N, Miranda Echague M, Mercado Amarilla M. Optimización de una técnica de PCR convencional para la amplificación de la región LCR y el gen E6 del virus del papiloma humano tipo 16. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2022 Agosto; 20(2).
49. Bonifaz D, et.al. Identificación Molecular de los VPH Oncogénicos Mediante PCR en Tiempo Real con Sondas Taqman. *Rev Cient Cienc Méd*. 2020; XXIII(2).
50. Soriano S, Falcon A, Mercado A. Comparación entre inmunomoduladores y crioterapia para el tratamiento de lesiones genitales en mujeres con VPH. *Revista de Investigación en Salud*. 2022 Noviembre; V(15).
51. Yao F, Dingfa W, Lijuan Q, et.al. Improvement of vaginal probiotics *Lactobacillus crispatus* on intrauterine adhesion in mice model and in clinical practice. *BMC Microbiology*. 2023 Marzo; XXIII(78).
52. Toro A, Laura T. Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer. *Medicina & Laboratorio*. 2021 Enero; XXV(2).
53. Clifford G, et.al. Prevalence and Genotype Distribution of Human Papillomavirus in Women with Abnormal Cervical Cytology in North America. *Journal of Clinical Virology*. 2019.
54. Castle P, et.al. Clinical Outcomes of ASC-H Cytology: A Multi-Institutional Study. *Cancer Cytopathology*. 2018.
55. Rodríguez G, et.al. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.. *Mensaje Bioquímico*. 2021 Junio; XLV.
56. Serretiello E, et.al. Prevalence and Distribution of High- and Low- Risk HPV Genotypes in Women Living in the Metropolitan Area of Naples: A Recent Update. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023; XXIV(2).
57. Mendoza L, Urdaneta J, Silva C, Maggiolo I, Baabel N, Mejía R. Virus de papiloma humano y lesión intraepitelial cervical en adolescentes embarazadas. *Revista Digital de Postgrado*. 2022; 11(1).
58. Sequera M, Matamoros A, Mendoza León M. Genotipos de VPH y cambios citológicos cervico-uterino en pacientes de una consulta ginecológica privada del Estado Carabobo, Venezuela. Marzo-octubre de 2017. *Revista Médica de Risaralda*. 2020 Junio; 26(1).

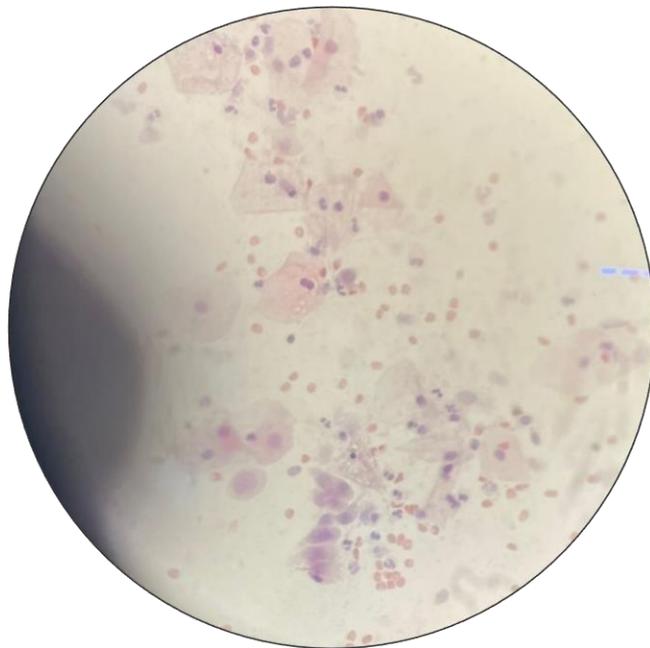
59. Vilema Vizúete E, Ramos Sánchez R, Pozo Hernández C, Morillo Cano J. Factores de riesgo de infección por VPH en estudiantes universitarios de Guayaquil. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2022 Septiembre; 62(5).
60. Salazar Torres Z, Heredia Cortez J, Zhingre Suárez A, Cárdenas Heredia F. Virus del papiloma humano de alto riesgo y factores asociados en mujeres de Ecuador. Revista de Investigación en Salud. 2022 septiembre; 5(15).
61. Malave Saltos J, Bermello Sornoza I, Cárdenas Saltos K, Guerrero Robles C, Recalde Rosado J, Santana Intriago O. Factores de riesgo que inciden para la presencia del cáncer cervicouterino. Revista Científica Dominio de las Ciencias. 2019 abril; 5(2).

## **ANEXOS**

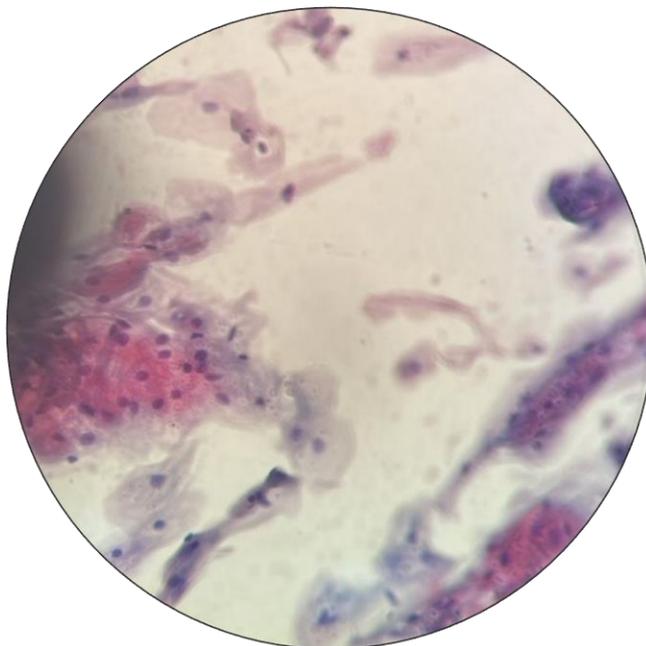
### **Anexo 1. Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US)**



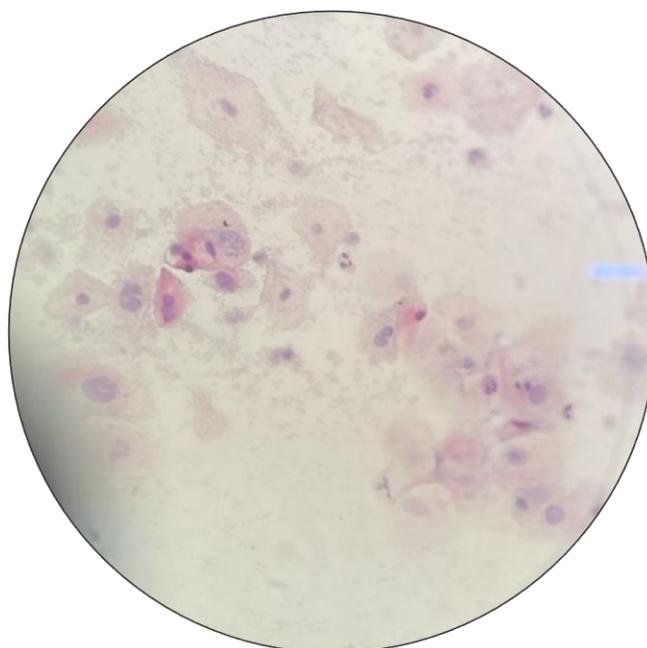
### **Anexo2. Células escamosas atípicas (ASC-H)**



**Anexo 3. Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (L-SIL)**



**Anexo 4. Lesión Intraepitelial de Bajo Grado (H-SIL)**



# Anexo 5. Inserto “Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)”

Sansure Biotech

## Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)

**Reference Number**

S3108E

**Product Name**

Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)

**Package Specification**

24 tests/kit, 48 tests/kit

**Intended Use**

The Human Papillomavirus DNA(23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) is used for *in vitro* qualitative detection of human papillomavirus (type 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 81, 82) presented in exfoliated cells from females' cervix.

This kit is used for the auxiliary diagnosis of human papillomavirus infection and can identify the specific types of human papillomavirus in the sample. The test results are for clinical reference only, and should not be used as the only indicator for evaluating the patient's condition. It is recommended to conduct a comprehensive analysis of the condition based on the patient's clinical manifestations and other laboratory tests.

*For in vitro diagnostic use only. For professional use only.*

**Summary**

Human papillomavirus (HPV) is a kind of non-enveloped double-stranded circular DNA virus with small molecular weight. It infects and parasitizes epithelial cells of human reproductive organs and other organs. HPV falls into two types clinically, including high-risk and low-risk HPV, according to the different degrees of pathogenicity or carcinogenic risk of different subtypes. Low-risk HPV mainly causes pathological changes such as exogenous wart in anal skin, male external genitalia, female labia, urethral orifice and vagina lower segment, and low-grade cervical intraepithelial neoplasia. High-risk HPV can cause not only external genital warts, but more seriously, external genital cancer, cervical carcinoma and high-grade cervical intraepithelial neoplasia.

**Test Principle**

By applying PCR technology and Taqman technology, the diagnostic kit uses pairs of specific primers and specific fluorescence probes of the above-mentioned 23 HPV-DNA types to test the specific DNA fragments of 23 types of HPV-DNA for genotyping by dividing into 6 reaction tubes.

The PCR detection system uses UNG enzyme + dUTP contamination-proof system to fully degrade possible PCR amplified products in order to avoid a false positive result.

The PCR detection system uses a positive internal control (internal standard) to monitor  $\beta$ -globin in human epidermal cells for the evaluation of amplification reaction of specimens and to monitor the presence of PCR inhibitors, as well as to evaluate the nucleic acid extraction efficiency, in order to avoid a false negative result.

**Components of the Diagnostic Kit**

No.	Reagent Name	Specification & Qty.		Main Ingredients
		24 tests/kit	48 tests/kit	
1	HPV Genotype-Enzyme Mix	288 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	288 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Taq DNA polymerase, UNG enzyme
2	HPV(16/18/33/39)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
3	HPV(45/59/65/68)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
4	HPV(51/52/53/66)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
5	HPV(31/56/58/ $\beta$ -globin)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
6	HPV(5/26/81/82)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
7	HPV(11/42/43/73)-PCR Mix	912 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	912 $\mu$ L/tube $\times$ 2 tubes	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
8	HPV Genotype-Negative Control	1000 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	1000 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	Normal saline
9	HPV Genotype-Positive Control	200 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	200 $\mu$ L/tube $\times$ 1 tube	Cloning plasmid containing the target gene fragment

**Note:**

- Do not mix or exchange components from different kits.
- Materials required but not provided: The nucleic acid extraction-purification kit (S10016E) or Sample Release Reagent (S1013E) manufactured by Sansure Biotech, Inc. for nucleic acid extraction.

**Storage Condition and Shelf Life**

The detection kit should be stored in a sealed pouch at -20  $\pm$  5  $^{\circ}$ C, and kept away from light. The shelf life of the kit is 12 months. Please refer to the outer box for the production date and expiration date.

- The kit can be stored stably at -20  $\pm$  5  $^{\circ}$ C after opening the lid. Once used, the kit should be frozen and thawed no more than 5 times.
- The reagents keep valid and stable before the expiry date on the outer package when transporting for 7 days in a sealed foam box containing coolant with the temperature lower than 20  $^{\circ}$ C.

**Compatible Instrument**

The diagnostic kit is applicable to Stratagene ABI7500, Life Technologies QuantStudio<sup>TM</sup>5 and SLAN-96P PCR instrument.

**Specimen Requirements**

- Applicable specimen type**  
Exfoliated cells from females' cervix.
- Specimen collection**
  - Requirements before the test:
    - Specimen should not be collected during females' menstrual period.
    - The objects should not have sex during the 48 hours before the collection.
    - The objects should not have vaginal douching or use intravaginal drug such as contraceptive salve during the 3 days before the collection.

Doc. #: HPV 23 Genotypes Manual

2

Doc. Version: V00

2.2 A disposable sterile cervical sampler (including cervical brush and cell preservation solution) is used for sample collection, and the specific steps are as follows:

For females who have suspected cervical infection, collect exfoliated cells from the cervix. Use a cotton swab to wipe the excessive secretions on the cervical opening. Use another swab (or cervical brush) that has been soaked in saline and insert it into the cervical mouth. Gently press it and rotate it clockwise for 3-4 circles to collect exfoliated cells. Place the swab or cervical brush with specimen in a sterile specimen collection tube containing sample storage reagents. Seal it and send it for detection.

### 3. Specimen storage and delivery

Specimens collected via the above-mentioned method can be used for immediate detection, or stored at room temperature for less than 24 hours, or at 2-8 °C for less than 120 hours, or at -20± 5 °C for less than 7 months. Freeze-thaw cycles should not exceed 7. Specimens should be transported in a sealed frozen pitcher with ice or in a sealed foam box with ice. Please place the specimens at -70 °C for long-term storage.

## Test Method

### 1. Preparation of reagents (performed at 'reagent preparation region')

- 1.1 Take out each component from the detection kit and place them at room temperature. When the components' temperature has reached room temperature, mix them for later.
- 1.2 Mix 6 kinds of HPV-PCR Mix (n × 38 μL) respectively with HPV Genotype-Enzyme Mix (6n × 2 μL) (n = number of specimens + 2 quality controls). Fully mix them to make a PCR-Masternix. Centrifuge it at 2000 rpm for 10 seconds and store it at 2-8 °C for later use.

### 2. Processing of Specimens (performed at 'specimen processing region', the negative control should be extracted with the specimens together)

Pipette 1 mL of specimen eluent from the specimen collection tube into a 1.5 mL sterilized centrifuge tube as the specimen to be tested, and process it as follows:

- 2.1 Processing method 1: It is recommended to use Sample Release Reagent (S1013E) manufactured by Sansure Biotech Inc. for nucleic acid extraction according to its instruction for use.
- 2.2 Processing Method 2: It is recommended to use The Nucleic Acid Extraction-Purification Kit (S10016E) manufactured by Sansure Biotech Inc. for nucleic acid extraction according to its instruction for use.

### 3. Loading of Specimens (performed at 'specimen processing region')

- 3.1 Specimens and HPV Genotype-Negative Control: Load 10 μL nucleic acid of specimens and the HPV Genotype-Negative Control that have been pre-processed above into the PCR reaction tube (avoid getting impurities such as cell debris), and repeat it for 6 times (Load 10 μL of the nucleic acid of one specimen respectively into 6 PCR reaction tubes. Be careful not to confuse them.)
- 3.2 HPV Genotype-Positive Control: Load 10 μL of the HPV Genotype-Positive Control into the PCR reaction tube and repeat it for 6 times (the HPV Genotype-Positive Control does not require pre-treatment).
- 3.3 Add 40 μL of the above-prepared 6 kinds of HPV PCR-Masternix into 6 PCR reaction tubes in sequence. Cover the tube lid. (If there are bubbles, you can flick with your fingers to remove them), centrifuge it at 2000 rpm for 10 seconds or shake it gently by hand until there is no obvious droplet on the tube wall.

### 4. PCR Amplification (Please refer to user manual of each instrument for the settings)

- 4.1 Place the PCR reaction tubes into the specimen well of amplifier. Input the settings of HPV Genotype-Negative Control, HPV Genotype-Positive Control and unknown specimens in the corresponding sequence, and input the specimens' names.

#### 4.2 Selection of PCR test channel:

- 4.2.1 Select FAM channel to test HPV (type 6, 11, 16, 45, 51, 56-DNA).
- 4.2.2 Select HEX or VIC channel to test HPV (type 18, 43, 53, 58, 59, 82-DNA).
- 4.2.3 Select ROX channel to test HPV (type 26, 35, 39, 42, 68-DNA and β-globin).
- 4.2.4 Select CY5 channel to test HPV (type 31, 33, 52, 66, 73, 81-DNA).

#### 4.3 Set cycle parameters:

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	UNG enzyme reaction	50 °C	2 min.	1
2	Taq enzyme activation	94 °C	5 min.	1
3	Denaturation	94 °C	15 sec.	45
	Annealing, extension, fluorescence signal collection	57 °C	30 sec.	
4	Device cooling (optional)	25 °C	10 sec.	1

When the settings are completed, save the settings and carry out the reaction procedure.

### 5. Result Analysis (Please refer to user manual of each instrument for the settings)

Results will be saved automatically when reactions are completed. Adjust Start, End and Threshold values of Baseline according to the analyzed graph (Users can adjust the values according to the actual situation. Start value can be set between 3-15, and End value between 5-20. Adjust the amplification curve of HPV Genotype-Negative Control to be flat or below threshold). Make sure that each parameter satisfies the requirements given in "6. Quality Control" and record Ct value.

### 6. Quality Control

- 6.1 HPV Genotype-Negative Control: No Ct values at FAM, HEX/VIC, ROX, and CY5 channel.
- 6.2 HPV Genotype-Positive Control: There are typical S-type amplification curves and the tested Ct values range from 24 to 30 at FAM, HEX/VIC, ROX, and CY5 channel.
- 6.3 The above requirements shall be met at the same time in the same experiment. Otherwise the test result is treated as invalid and needs to be re-tested.

### Positive Reference Values

Through the research on reference value (ROC curve method), the Ct positive reference value of the diagnostic kit for detecting the target gene is determined to be 39, and the Ct positive reference value for detecting the internal control is to be 40.

### Explanation of Detection Results

#### Determination of negative or positive result

The test results of specimens are determined according to the following tables

No.	PCR-Mix	IF FAM channel ≤ 39, it is	IF HEX channel ≤ 39, it is	IF ROX channel ≤ 39, it is	IF CY5 channel ≤ 39, it is
1	HPV(16/18/33/39)	HPV 16	HPV 18	HPV 39	HPV 33
2	HPV(45/59/35/66)	HPV 45	HPV 59	HPV 35	HPV 66
3	HPV(51/52/53/68)	HPV 51	HPV 53	HPV 68	HPV 52
4	HPV(31/56/58/β-globin)	HPV 56	HPV 58	β-globin	HPV 31

Revision Date: 10-10-2020

Page 1 /

## Sansure Biotech

5	HPV(6/26/8182)	HPV 6	HPV 82	HPV 26	HPV 81
6	HPV(11A2/4373)	HPV 11	HPV 43	HPV 42	HPV 73

Conclusion	Ct value of sample	Ct value of $\beta$ -globin
Positive	$\leq 39$ (at any channel of FAM, HEX, ROX or CY5)	$\leq 40$
Others*	$\leq 39$ (at any channel of FAM, HEX, ROX or CY5)	> 40 or N/A
Negative	> 39 (at all channels of FAM, HEX, ROX and CY5)	$\leq 40$
Invalid	> 39 (at all channels of FAM, HEX, ROX and CY5)	> 40 or N/A

**Note:**

If the test result of one specimen is invalid, the causes should be found and eliminated. And it's necessary to re-collect the specimen and test it again. (If the result of the repeated test is still invalid, please contact Sansure Biotech Inc.)

\* This suggests that there are no cervical epithelial cells in the specimen, but the patient has recently been exposed to HPV, but it can not be determined whether the patient is infected with HPV. It is suggested to collect the specimen again for detection. If the re-tested results remain the same, then the specimen is positive with the genotype.

### Limitations of Detection Method

- This diagnostic kit can only be used for the detection of the 23 types of HPV DNA (type 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 81, 82).
- The test result can be used only for clinical reference. Clinical diagnosis should take other factors into account, such as symptoms, medical history, test results from other labs and treatment response.
- Possible reasons for a false negative result:
  - Inappropriate collection, delivery and processing of specimens and low viral titer may result in a false negative result.
  - Mutations in target sequences of High-risk HPV or sequence change due to other causes may result in a false negative result.
  - Inappropriate storage of diagnostic kits may result in a false negative result.
  - Other unproved interference or PCR inhibitors may also result in a false negative result.
- Cross-contamination occurring in specimen processing may result in a false positive result.

### Product Performance Index

#### 1. Accuracy

Use the kit to detect national genotype references or the enterprise's work references for the 23 types of HPV that have been standardized, and the results are all positive and genotyping results are correct without cross-contamination.

#### 2. Specificity

The verified cross-reactivity of other HPV genotypes, related pathogens, etc. and their verified concentration levels are as follows (All results tested by this kit are negative):

Names	Cross Reaction Concentration	Names	Cross Reaction Concentration
<b>Related Pathogens</b>			
Chlamydia trachomatis	1.00E+06 IFU/mL	Neisseria gonorrhoeae	1.00E+06 CFU/mL
Ureaplasma Urealyticum	1.00E+06 CCU/mL	Candida albicans	1.00E+06 CFU/mL
Mycoplasma hominis	1.00E+06 CCU/mL	Trichomonas vaginalis	1.00E+06 cells/mL
Herpes simplex virus type 2	1.00E+06 PFU/mL	Treponema pallidum	1.00E+06 copies/mL
<b>Human papillomavirus out of the detection range of the kit</b>			
HPV 40	1.00E+06 copies/mL	HPV 44	1.00E+06 copies/mL
HPV 54	1.00E+06 copies/mL	HPV 61	1.00E+06 copies/mL
HPV 67	1.00E+06 copies/mL	HPV 69	1.00E+06 copies/mL
HPV 70	1.00E+06 copies/mL	HPV 71	1.00E+06 copies/mL
HPV 72	1.00E+06 copies/mL	HPV 83	1.00E+06 copies/mL

#### 3. Precision

The coefficient of variation (CV,%) of the Ct value of each genotype within and between batches is not more than 5%.

#### 4. Limit of Detection

Limit of detection study has been conducted on 23 types of HPV DNA, and the limit of detection for each genotype is determined to be 400 copies/mL.

#### 5. Interfering substances

The evaluated concentration levels and interference conditions of the verified interfering substances are as follows:

Interfering substances	Concentration Level	Whether there is interference
Hemoglobin	2 g/L	NO
Leukocyte	1.00E + 07 cells/mL	NO
Cervical mucus	10%	NO
Contraceptive glue	0.5%	NO
Vaginal lavage	0.5%	NO
Antifungal ointment containing 2% clotrimazole	0.5%	NO
Antifungal ointment containing 4% miconazole	0.5%	NO
Vaginal lubricant	10%	NO

### Precautions

- The product can only be used for in vitro diagnosis. Please read the product manual carefully before operation.

Doc. #: HPV 23 Genotypes Manual

2

Doc. Version: V00

2.2 A disposable sterile cervical sampler (including cervical brush and cell preservation solution) is used for sample collection, and the specific steps are as follows:  
 For females who have suspected cervical infection, collect exfoliated cells from the cervix. Use a cotton swab to wipe the excessive secretions on the cervical opening. Use another swab (or cervical brush) that has been soaked in saline and insert it to the cervical mouth. Gently press it and rotate it clockwise for 3-4 circles to collect exfoliated cells. Place the swab or cervical brush with specimen in a sterile specimen collection tube containing sample storage reagents. Seal it and send it for detection.

### 3. Specimen storage and delivery

Specimens collected via the above-mentioned method can be used for immediate detection, or stored at room temperature for less than 24 hours, or at 2-8 °C for less than 120 hours, or at -20 ± 5 °C for less than 7 months. Freeze-thaw cycles should not exceed 7. Specimens should be transported in a sealed frozen pitcher with ice or in a sealed foam box with ice. Please place the specimens at -70 °C for long-term storage.

## Test Method

### 1. Preparation of reagents (performed at 'reagent preparation region')

1.1 Take out each component from the detection kit and place them at room temperature. When the components' temperature has reached room temperature, mix them for later.  
 1.2 Mix 6 kinds of HPV-PCR Mix ( $n \times 38 \mu\text{L}$ ) respectively with HPV Genotype-Enzyme Mix ( $6n \times 2 \mu\text{L}$ ) ( $n$  = number of specimens + 2 quality controls). Fully mix them to make a PCR-Mastermix. Centrifuge it at 2000 rpm for 10 seconds and store it at 2-8 °C for later use.

### 2. Processing of Specimens (performed at 'specimen processing region', the negative control should be extracted with the specimens together)

Pipette 1 mL of specimen eluent from the specimen collection tube into a 1.5 mL sterilized centrifuge tube as the specimen to be tested, and process it as follows:

2.1 Processing method 1: It is recommended to use Sample Release Reagent (S1013E) manufactured by Sansure Biotech Inc. for nucleic acid extraction according to its instruction for use.  
 2.2 Processing Method 2: It is recommended to use The Nucleic Acid Extraction-Purification Kit (S10016E) manufactured by Sansure Biotech Inc. for nucleic acid extraction according to its instruction for use.

### 3. Loading of Specimens (performed at 'specimen processing region')

3.1 Specimens and HPV Genotype-Negative Control: Load 10  $\mu\text{L}$  nucleic acid of specimens and the HPV Genotype-Negative Control that have been pre-processed above into the PCR reaction tube (avoid getting impurities such as cell debris), and repeat it for 6 times (Load 10  $\mu\text{L}$  of the nucleic acid of one specimen respectively into 6 PCR reaction tubes. Be careful not to confuse them.)  
 3.2 HPV Genotype-Positive Control: Load 10  $\mu\text{L}$  of the HPV Genotype-Positive Control into the PCR reaction tube and repeat it for 6 times (the HPV Genotype-Positive Control does not require pre-treatment).  
 3.3 Add 40  $\mu\text{L}$  of the above-prepared 6 kinds of HPV PCR-Mastermix into 6 PCR reaction tubes in sequence. Cover the tube lid. (If there are bubbles, you can flick with your fingers to remove them), centrifuge it at 2000 rpm for 10 seconds or shake it gently by hand until there is no obvious droplet on the tube wall.

### 4. PCR Amplification (Please refer to user manual of each instrument for the settings)

4.1 Place the PCR reaction tubes into the specimen well of amplifier. Input the settings of HPV Genotype-Negative Control, HPV Genotype-Positive Control and unknown specimens in the corresponding sequence, and input the specimens' names.

4.2 Selection of PCR test channel:

4.2.1 Select FAM channel to test HPV (type 6,11,16,45,51,56-DNA).  
 4.2.2 Select HEX or VIC channel to test HPV (type 18,43,53,58,59,62-DNA).  
 4.2.3 Select ROX channel to test HPV (type 26,35,39,42,68-DNA and  $\beta$ -globin).  
 4.2.4 Select CYS channel to test HPV (type 31,33,52,66,73,81-DNA).

4.3 Set cycle parameters:

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	UNG enzyme reaction	50 °C	2 min.	1
2	Taq enzyme activation	94 °C	5 min.	1
3	Denaturation	94 °C	15 sec.	45
	Annealing, extension, fluorescence signal collection	57 °C	30 sec.	
4	Device cooling (optional)	25 °C	10 sec.	1

When the settings are completed, save the settings and carry out the reaction procedure.

### 5. Result Analysis (Please refer to user manual of each instrument for the settings)

Results will be saved automatically when reactions are completed. Adjust Start, End and Threshold values of Baseline according to the analyzed graph (Users can adjust the values according to the actual situation. Start value can be set between 3-15, and End value between 5-20. Adjust the amplification curve of HPV Genotype-Negative Control to be flat or below threshold). Make sure that each parameter satisfies the requirements given in "5. Quality Control" and record Ct value.

### 6. Quality Control

6.1 HPV Genotype-Negative Control: No Ct values at FAM, HEX/VIC, ROX, and CYS channel.  
 6.2 HPV Genotype-Positive Control: There are typical S-type amplification curves and the tested Ct values range from 24 to 30 at FAM, HEX/VIC, ROX, and CYS channel.  
 6.3 The above requirements shall be met at the same time in the same experiment. Otherwise the test result is treated as invalid and needs to be re-tested.

## Positive Reference Values

Through the research on reference value (ROC curve method), the Ct positive reference value of the diagnostic kit for detecting the target gene is determined to be 39, and the Ct positive reference value for detecting the internal control is to be 40.

## Explanation of Detection Results

### Determination of negative or positive result

The test results of specimens are determined according to the following tables

No.	PCR-Mix	IF FAM channel $\leq 39$ , it is	IF HEX channel $\leq 39$ , it is	IF ROX channel $\leq 39$ , it is	IF CYS channel $\leq 39$ , it is
1	HPV(16/18/33/39)	HPV 16	HPV 18	HPV 39	HPV 33
2	HPV(45/59/35/66)	HPV 45	HPV 59	HPV 35	HPV 66
3	HPV(51/52/53/68)	HPV 51	HPV 53	HPV 68	HPV 52
4	HPV(31/56/58/ $\beta$ -globin)	HPV 56	HPV 58	$\beta$ -globin	HPV 31

gions should not be cross-used.

en should be handled as if infectious. Wear laboratory coats, protective disposable gloves and change the gloves often to avoid cross-contamination between  
imens and waste must meet relevant requirements outlined in local, state and national regulations.  
ust be fully thawed at room temperature and mixed thoroughly.

oz N, Meijer C.J.L.M, Shah K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J. Clin. Pathol. 2002, 55(4): 244-266.

veras B, et al. Human papilloma virus testing for primary screening in women at low risk of developing cervical cancer The Green experience. Gynecol. Oncol.

The role of human papillomavirus testing in cervical screening. J. Clin. Virol. 2005, 32: S34-42.

ying Hu, Ruifang Wu, Zhihua Liu, Jiansheng Xie, Ruizhen Li, Wen Chen, Fanghui Zhao, Youlin Qiao, Effect of HPV Multiplex PCR Fluorescence Test on Cervical  
Cancer 2009, 8(4): 315-319.

R, Zhang W, Rong X, Zhu Y, Wu R, Belinson J.L. SNIPER: a novel assay for human papillomavirus testing among women in Guizhou, China. Int. J.  
O(5): 1006-101

mbols	Meanings	Symbols	Meanings
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Date of Manufacture

## Anexo 6. Reactivos del Kit diagnóstico de PCR

Nombre del reactivo	Especificaciones
HPV Genotype-Enzyme Mix	Taq DNA polymerase, enzima UNG
HPV (16/18/33/39)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
HPV (45/59/35/66)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
HPV (51/52/53/68)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
HPV (31/56/58/ $\beta$ -globin)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
HPV (6/26/81/82)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
HPV (11/42/43/73)-PCR Mix	Primer, probe, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , PCR buffer
Control Negativo	Solución salina normal
Control Positivo	Plásmido de clonación que contiene el fragmento del gen diana.

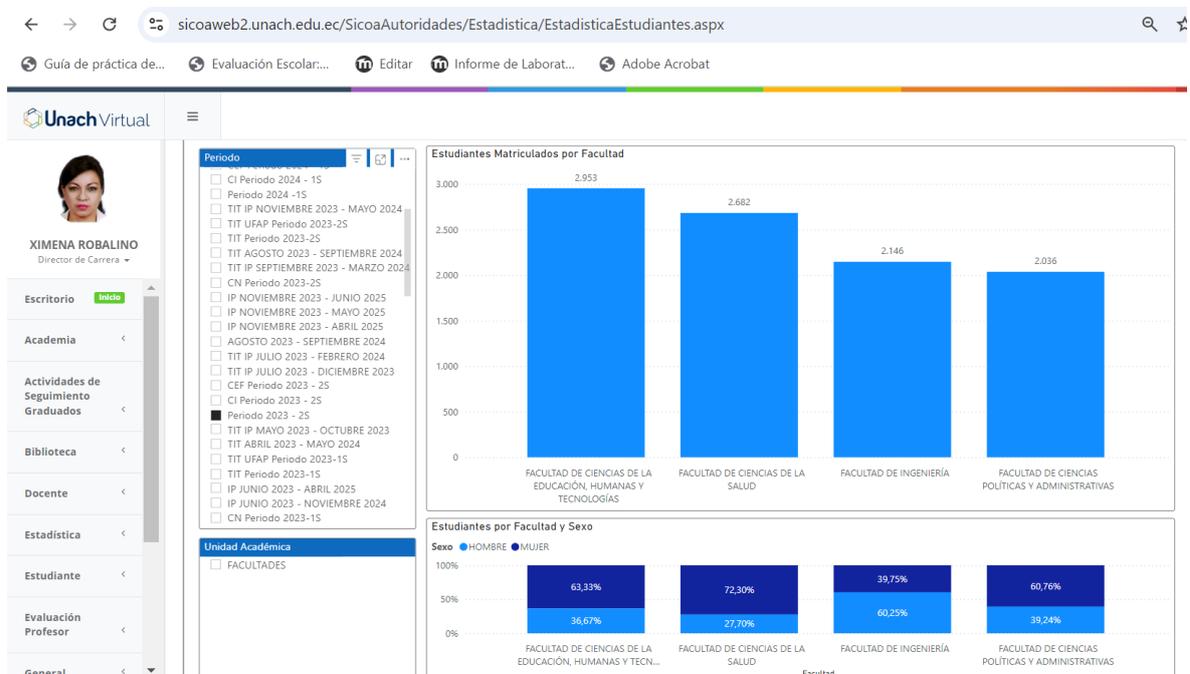
**Fuente:** Biotech S, inventor; Biotech S, assignee. Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing). Indonseia. 2020 Agosto 10.

## Anexo 7. Pasos de la amplificación de la PCR

Procedimientos	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Reacción de enzima UNG	50 °C	2 min	1
Activación enzima Taq	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	15 min	45
Recocido, extensión, recolección de señales de fluorescencia.	57 °C	30 seg	
Refrigeración del dispositivo (opcional)	25 °C	10 seg	1

**Fuente:** Biotech S, inventor; Biotech S, assignee. Human Papillomavirus DNA (23 genotypes) Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing). Indonseia. 2020 Agosto 10.

## Anexo 8. Estadística de la población de la Facultad de Ciencias de la Salud 2023-2S (SICOA)



## Anexo 9. Carta de aprobación definitiva- estudios observacionales/de intervención



Anexo 25

### Carta de aprobación definitiva- estudios observacionales/de intervención

**Nombre del Investigador Principal:** Gisnella María Cedeño Cajas.

**INSTITUCIÓN A LA QUE PERTENECE:** Instituto Posgrado de la Universidad Estatal del Sur de Manabí

**ASUNTO: REVISIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN (observacional/intervención)**

Por medio de la presente y una vez que el protocolo de investigación presentado por el (la) Sr (a). Gisnella María Cedeño Cajas, que titula "Determinación de los genotipos del VPH y los diferentes grados de lesiones citológicas en las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo durante el periodo 2023-2025. Riobamba-Ecuador", ha ingresado al Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Instituto Superior Tecnológico Portoviejo, con fecha 21 de agosto 2023 (versión 1), y cuyo código asignado es 1692888695, luego de haber sido revisado y evaluado, dicho proyecto está **APROBADO** para su ejecución en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo durante el periodo 2023-2025. Riobamba. Ecuador al cumplir con todos los requerimientos éticos, metodológicos y jurídicos establecidos por el reglamento vigente para tal efecto.

Como respaldo de lo indicado, reposan en los archivos del CEISH-ITSUP, tanto los requisitos presentados por el investigador, así como también los formularios empleados por el comité para la evaluación del mencionado estudio.

En tal virtud, los documentos aprobados sumillado del CEISH-ITSUP que se adjuntan en físico al presente informe son los siguientes:

- Copia del protocolo de investigación "Determinación de los genotipos del VPH y los diferentes grados de lesiones citológicas en las estudiantes de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo durante el periodo 2023-2025. Riobamba-Ecuador", Nro. de versión 2 #1692888695, fecha de aprobación 16 de septiembre 2023 y Nro. de hojas (27).
- Documento de consentimiento informado, Nro. de hojas (5).
- Otros Instrumentos presentados y aprobados, según sea el caso: Carta de autorización fecha de aprobación 28-07-2023 Nro de hoja 1, Carta de interés fecha 18-08-2023 Nro de hoja 2, Declaración de conflicto o no conflicto de intereses fecha 30-07-2023 Nro de hoja 1, Currículo Nro de hojas 23, Carta de compromiso del investigador principal fecha 18-08-2023 Nro de hojas 2, Solicitud de Evaluación Nro de hojas 1.

Cabe indicar que la información de los requisitos presentados es de responsabilidad exclusiva del investigador, quien asume la veracidad, originalidad y autoría de los mismos.

Así también se recuerda las obligaciones que el investigador principal y su equipo deben cumplir durante y después de la ejecución del proyecto en la (Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo):

- Informar al CEISH-ITSUP la fecha de inicio y culminación de la investigación.
- Presentar a este comité informes periódicos del avance de ejecución del proyecto, según lo estime el CEISH-ITSUP.
- Cumplir todas las actividades que le corresponden como investigador principal, así como las descritas en el protocolo con sus tiempos de ejecución, según el cronograma establecido en dicho proyecto, vigilando y respetando siempre los aspectos éticos, metodológicos y jurídicos aprobados en el mismo.
- Aplicar el consentimiento informado a todos los participantes, respetando el proceso definido en el protocolo y el formato aprobado.
- Al finalizar la investigación, entregar al CEISH-ITSUP el informe final del proyecto.

Atentamente,



JOSANNA MABEL  
SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

Dr. Mabel Sánchez Rodríguez  
Presidenta del CEISH-  
ITSUP

Garca Moreno y América  
PORTOVIEJO - ECUADOR

593-5-2636914



ROBERTH OLMEDO  
ZAMBRANO SANTOS

Dr. Roberth Zambrano Santos  
Secretario del CEISH-  
ITSUP

097 894 7899



www.itsup.edu.ec

