

**Estudio “Genotipificación del Virus
Papiloma Humano en consultantes de los
centros de enfermedades de transmisión
sexual (CETS) con diagnóstico de
Condiloma Acuminado”**

Informe Final
CONASIDA
División de Prevención y Control Enfermedades
MINISTERIO DE SALUD
Abril 2007

Este Estudio de Prevalencia puntual, fue realizado por la Comisión Nacional del Sida del Ministerio de Salud con financiamiento del Fondo Global en Chile y la colaboración del Instituto de Salud Pública y los Centros de ETS de la Región Metropolitana.

EQUIPO

Ministerio de Salud.

René Castro Santoro, Médico Gineco Obstetra, Programa de la Mujer.
Félix Fich Schilcrot , Médico Dermatólogo, Comité Asesor de ETS,
Marta Prieto, Matrona-MSP. Programa Cáncer Cérvico – Uterino.
Eugenia Hernandez Collao, Matrona. Salud Sexual y Reproductiva
Jorge Pantoja Álvarez, Psicólogo. Asesor Metodológico, CONASIDA.

Instituto de Salud Pública

Judith Mora Riquelme, Médico Veterinario, Sección Virología.
Eugenio Ramírez Villalobos, Bioquímico, Sección Virología

Centros de ETS.

H.San José: Dra. Ester Santander, Mat. Paola Arévalo
H.Salvador: (Dermatología) Dra. Rina Ortega, Eu.María Ríos
H.San Borja Arriarán: Dra. Valeria Neumann, Mat.Brenda Mesías,
Mat. Sonia Barreda
H.San Juan de Dios: Dra. María Soledad Bertoló, Mat. Nelly Martínez
H.Barros Luco: Dra.Claudia Quiroz,Dr. Patricio Amaro, Dra. Irene Araya,
Dr.Francisco Bobadilla, Mat.Angélica Bello y Mat. Amalia Adasme
H.Sótero del Río: Dr. Aurelio Salvo, Matrona Jeannete Gálvez

Coordinación General:

Carolina Peredo Couratier, Matrona. Proyecto “Mejoramiento de la Calidad de Atención en Salud Sexual en los Centros de Enfermedades de Transmisión Sexual” del Fondo Global, CONASIDA, Ministerio de Salud.

En el diseño del Estudio colaboraron.

Dra. Beatriz Marincovich, Eu. Pilar Planet y Mat. Alejandra Burgos.

Análisis e Informe Final: Jaime Barrientos y Carlos Calderón, Escuela de Psicología, Universidad Católica del Norte.

INDICE

EQUIPO	2
ANTECEDENTES	4
I. FACTORES DE RIESGO DE INFECCION POR VPH	8
II. PREVALENCIA DE VPH EN AMÉRICA LATINA Y CHILE.....	10
III. GENOTIPOS	11
ANALISIS DE DATOS	13
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. MÉTODO.....	14
<i>a.- Muestra.....</i>	<i>14</i>
<i>b.- Cálculo del tamaño muestral.....</i>	<i>15</i>
<i>c.- Toma y envío de muestras</i>	<i>15</i>
<i>d.- Características de la muestra.....</i>	<i>16</i>
<i>e.- Variables consideradas en el Estudio</i>	<i>16</i>
<i>f.- Plan de Análisis Realizado</i>	<i>17</i>
<i>g.- Aspectos éticos.....</i>	<i>17</i>
<i>h.- Dificultades del proceso.....</i>	<i>17</i>
SÍNTESIS DE RESULTADOS.....	17
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	30
<i>Anexo 1 Tablas de resultados</i>	<i>32</i>
<i>Anexo 2 Formularios usados por CONASIDA para realizar la investigación (Encuesta de comportamiento sexual y Consentimiento Informado).....</i>	<i>36</i>
<i>Anexo 3 Informe sobre los material y métodos usados para la detección de VPH y Genotipificación</i>	<i>40</i>
BIBLIOGRAFÍA	51

ANTECEDENTES

El VIRUS PAPILOMA HUMANO (VPH) es un virus DNA que pertenece a la familia Papovaviridae del género papilomavirus.¹

El VPH genital ha sido descrito como una de las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) de mayor importancia epidemiológica en la actualidad, principalmente, entre la población sexualmente activa², afectando a un elevado porcentaje de mujeres que viven en los países subdesarrollados y siendo, también, sumamente frecuente en hombres sexualmente activos³. Además, la infección genital por el VPH es la enfermedad de transmisión sexual de tipo viral más común en el mundo. De esta forma, el Condiloma Acuminado es una de las ETS más frecuentes en EE.UU. y es una enfermedad causada por el Virus Papiloma Humano (VPH). Algunos tipos de Virus Papiloma pueden producir cáncer en la zona infectada.

El aumento de esta infección viral ha generado inquietud en el ámbito de la salud y las políticas públicas, debido al alto potencial infectante, las implicaciones que acarrea y las dificultades de la conducta terapéutica y de control. Además, muchas de estas inquietudes se están discutiendo recientemente en Chile dado la próxima aprobación de la primera vacuna para el VPH. (Hay dos vacunas próximas a aprobarse: Gardasil del laboratorio MSD, para los tipos 6, 16 y 18 y 11 y Cervarix del laboratorio GlaxoSmithKline para los tipos 16,18).

Asimismo, el VPH es el principal agente etiológico infeccioso asociado con la patogénesis del CÁNCER DE CUELLO UTERINO (CCU). La infección persistente con uno de los tipos de VPH ha sido descrita como la causa necesaria para el desarrollo del CCU⁴ y los VPH, agentes etiológicos del CCU⁵.

Esta patología viral, si persiste en el tiempo, puede ocasionar neoplasias de diverso tipo⁶ y se ha visto involucrada en la patogenia de diversos tumores benignos y malignos, constituyendo el factor de riesgo más importante para el desarrollo de CCU. Este virus genera costos económicos y sociales a los afectados de diverso tipo como tiempo y salario perdidos durante el tratamiento, largo sufrimiento, trastornos psicológicos en la vida afectiva - sexual y en la auto imagen.

Evidencias epidemiológicas, virológicas y clínicas demuestran que hay una estrecha asociación entre tipos específicos de VPH y el CCU^{7, 8}. Generalmente, la infección por VPH precede al desarrollo de la enfermedad cervical y los VPH están presentes en las lesiones precursoras de éstas. La infección por VPH es una condición necesaria, pero no suficiente, ya que se requiere de factores que participan en la oncogénesis cervical.

Se plantea que el conocimiento de la virología y las manifestaciones clínicas de este virus constituyen el eslabón fundamental en el entendimiento del proceso neoplásico⁹. El VPH está asociado a displasia, neoplasia intraepitelial y CCU y, además, los estudios epidemiológicos de las lesiones premalignas del cuello uterino han demostrado una fuerte asociación entre el comportamiento sexual y la

aparición de tumores malignos, aunque, si bien el VPH no tiene un rol oncogénico directo, juega un rol que es potenciado por factores de diverso tipo.

Según datos recientes, cada año aproximadamente medio millón de mujeres por todo el mundo desarrolla el CCU¹⁰. El 80% de ellas vive en países pobres. Por ejemplo, en los países subdesarrollados el CCU ocupa el segundo lugar entre las causas de muerte por cáncer en la mujer. Además, una docena de tipos de VPH ha sido identificada en el 99 % de especímenes de biopsia de CCU por todo el mundo.¹¹

Un meta – análisis hecho por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), que incluyó un total de 10,058 casos de CCU de 85 estudios publicados, señala que los tipos de VPH más comunes identificados en CCU eran el 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 y 70. Además, sobre los 2/3 de los casos de CCU estaban asociados con una infección de VPH tipo 16 (51.0 %) o 18 (16.2 %). También, y a pesar de la importancia aplastante del VPH, otros factores favorecen la presencia (al de CCU después de una infección VPH). Igualmente, según nueve estudios de control de caso del IARC,¹² se ha confirmado el efecto adverso del empleo a largo plazo de anticonceptivos orales, de fumar y ser sexualmente activos.

Existe evidencia científica que indica que más del 90% de todos los CCU se pueden atribuir a ciertos tipos de VPH, de los cuales, el VPH 16 representa la mayor proporción (alrededor de 50%), seguido de los tipos 18 (12%), 45 (8%) y 31 (5%)¹³. Asimismo, un meta análisis sobre CCU y VPH, basado en 57 estudios, sugiere un riesgo de desarrollo de CCU invasivo que aumenta aproximadamente al 100 % en personas de clase sociales altas y bajas y un riesgo del 60 % para displasia, incluyendo el carcinoma in situ. No obstante, si bien la diferencia fue observada en todos los países, ésta era más fuerte en aquellos de ingresos bajos/medios y mayor en Norteamérica que en Europa¹⁴.

La situación del CCU en Chile indica que la mortalidad alcanzó una tasa de 8,3 por 100.000 mujeres el año 2004 y, según los datos del último decenio, la tendencia era descendente¹⁵. En Chile, el CCU ocupa el primer lugar entre los cánceres ginecológicos pelvianos y representa la segunda causa de muerte en las mujeres adultas entre 24 y 65 años, constituyendo un importante problema de salud pública¹⁶. El año 2004 fallecieron 676 mujeres, ocupando el quinto lugar entre las muertes por cáncer en la mujer y el primer lugar en la tasa de años de vida potencialmente perdidos, con 129 por 100.000 mujeres, produciendo un importante impacto social y económico, ya que afecta a mujeres relativamente jóvenes y en edad productiva¹⁷. La incidencia estimada en el servicio público chileno indica que anualmente se producen 1300 casos nuevos

Tabla 1. Número de muertes y tasa de mortalidad por cáncer cérvico uterino, bruta y ajustada por edad. Chile, 1990-2003

Año	N	Tasa bruta	Tasa ajustada
1990	789	11,8	14,3
1995	731	10,2	11,5
2000	683	8,9	9,3
2003	677	8,5	8,5

Fuente: Instituto Nacional de Estadísticas de Chile. Tasa: por 100.000 mujeres.

En el período 1990-2003 no se registraron muertes de mujeres menores de 15 años, hubo 2 en el rango de 15 -19 años, 17 entre 20 -24 años (0,2%), 6.263 entre 25 - 64 años (61,6%), y 3.893 fallecimientos en mayores de 64 años (38,2%)¹⁸.

El Condiloma Acuminado es la ETS más importante en nuestro país, fundamentalmente, en adolescentes y representa el 50% de los casos notificados en mujeres y el 39.7% en hombres¹⁹. El alto porcentaje de Condilomas en mujeres adolescentes podría ser la explicación para la alta incidencia de CCU que se presenta en nuestro país²⁰. Si se observa la tabla siguiente (Nº 2), se constata que los casos notificados hasta el 2003 muestran una tendencia al aumento del Condiloma en población que se atiende en Centros Centinelas de ETS.

Tabla 2. Casos notificados de condilomas acuminados en Centros Centinelas ETS según sexo, por grupo de edad - Chile, 2000 - 2003ⁱ

Grupo de edad	2000			2001			2002			2003		
	Ambos Sexos	Hombre	Mujer	Ambos Sexos	Hombre	Mujer	Ambos Sexos	Hombre	Mujer	Ambos Sexos	Hombre	Mujer
1 - 4	5	1	4	1	0	1	4	2	2	8	2	6
5 - 9	2	0	2	3	1	2	4	2	2	5	1	4
10-14s	8	1	7	5	3	2	13	0	13	8	3	5
15-19	118	27	91	118	26	92	132	27	105	153	33	120
20-24	170	63	107	214	90	124	194	67	127	241	86	155
25-34	167	68	99	185	87	98	196	80	116	258	101	157
35-44	67	25	42	70	30	40	70	26	44	108	47	61
45-54	26	13	13	24	9	15	39	11	28	45	18	27
55 y más	20	10	10	16	11	5	11	5	6	22	12	10
TOTAL	583	208	375	636	257	379	663	220	443	848	303	545

Actualmente, se ha descrito en el mundo más de 160 genotipos diferentes de VPH, los que están definidos por la variabilidad de sus genes.

El VPH se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo y provoca un amplio espectro de enfermedades epiteliales: desde verrugas a papilomas en los epitelios de distintas mucosas, ya que poseen un tropismo específico²¹. Más de 40 estos tipos de VPH se han asociado con patología anogenital y se han dividido en "bajo riesgo" y "alto riesgo" de producir cáncer. Entre los virus pertenecientes al primer grupo ("bajo riesgo"), están los tipos 6 y 11, que son responsables de la aparición de las verrugas genitales o Condilomas que constituyen, como se señaló previamente, la enfermedad de transmisión sexual de origen viral más difundida en

ⁱ Datos entregados por el Departamento de epidemiología del Ministerio de Salud.

el mundo. Entre los tipos de “alto riesgo” se incluyen el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 y se han detectado en lesiones premalignas y malignas del tracto anogenital por lo que se plantea la existencia de una fuerte asociación entre éstos y la aparición del cáncer. Estudios epidemiológicos han demostrado que los tipos 16 y 18 son agentes etiológicos del CCU. Igualmente, esta asociación ha sido comprobada por innumerables estudios que, independiente de su diseño o de la población analizada, ratifican la asociación causal la infección persistente por VPH con esta neoplasia.

EL VPH, dependiendo del tipo y de la lesión clínica, puede transmitirse por contacto cutáneo, relación sexual, transmisión perinatal, por escamas infectadas directa o indirectamente y, posiblemente, por fómites. El período de incubación del VPH varía desde tres semanas a 8 meses, con un promedio de tres meses.

En cuanto al genotipo del VPH y su localización más frecuente en piel se tiene²²: verruga vulgar (2, 4, 7); verruga plantar (1, 4); verruga plana (3, 10, 28, 41); epidermodisplasia verruciforme (5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 36, 46, 47, 49, 50); en mucosas (bajo riesgo): papilomas anogenitales, cervicales, orofaringe y tracto respiratorio (6, 11, 30, 34, 40, 42, 44, 55, 57, 59); en mucosas (alto riesgo); papilomas anogenitales y cervicales, papulosis Bowenoide, displasia cervical, orofaringe, cáncer cervical y anogenital (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56).

Según recientes estudios, el diagnóstico clínico del Condiloma Acuminado está asociado con VPH de bajo riesgo (tipos 6 y 11), mientras que las otras lesiones, con tipos 16, 18, 31 y 33²³. Asimismo, otro estudio sugiere que la presencia de Condiloma Acuminado vulvar muestra evidencia de infección por VPH de la vulva²⁴. Datos provenientes del uso de la técnica de hibridación indican que el Condiloma Acuminado en jóvenes está asociado con el mismo tipo de VPH encontrado en lesiones anogenitales en adultos²⁵. Además, ADN en VPH se ha detectado más en lesiones de VPH sugestivas (VPH-suggestive lesions), comparadas con no - VPH, en las que el ISH (hibridación in situ) era invariablemente negativo²⁶. También, dado la dificultad de la extracción del ADN, el riesgo de degradación del ADN y su contaminación, hacen que el ISH permanezca más adaptable como material de archivo sobretodo en la práctica clínica rutinaria²⁷.

Además, dependiendo de la técnica utilizada, el DNA de VPH se detecta en prácticamente la totalidad de los CCU y en más del 90% de las lesiones preinvasoras de alto grado.

Finalmente, la presencia de enfermedad por VPH en personas viviendo con VIH/SIDA presenta, generalmente, una larga evolución, con persistencia de lesiones condilomatosas por largo tiempo, resistentes a los tratamientos habituales, correlacionándose con el estado inmunológico del paciente. Asimismo, se ha observado en estas personas tasas mayores de cáncer rectal asociadas a Condilomas persistentes anales. Las mujeres VIH positivas tienen un alto predominio de VPH y son afectadas por una más amplia gama de tipos de VPH que mujeres seronegativas²⁸.

I. FACTORES DE RIESGO DE INFECCION POR VPH

El principal factor de riesgo es el número de parejas sexuales durante la vida^{29, 30} hallazgo consistente y que se repite en la mayoría de los trabajos realizados en diferentes partes del mundo, si bien no es el único factor relacionado al VPH. Además, el número de parejas sexuales fue un factor de riesgo relativo mayor para VPH de “alto riesgo” que para VPH de “bajo riesgo”³¹. Por ejemplo, se indica que las mujeres con múltiples prácticas sexuales y que, además, tenían embarazos e interrupciones de éstos a temprana edad, así como historias de infecciones, aumentan el riesgo de padecer la enfermedad³². Otro estudio efectuado en Venezuela indicaba que el grupo más afectado por VPH tenía entre 15 - 20 años de edad (44%), seguido por el grupo entre 21 -25 años (30%), pero, además, este mismo estudio señalaba que el 70% de las pacientes había tenido más de una pareja sexual y que el 96 % tuvo su primera relación sexual antes de los 20 años³³. En otra investigación con mujeres de Bogotá, se encontró un mayor riesgo de VPH en mujeres que han tenido más de cinco compañeros sexuales y cuya pareja sexual no usaba condón.

Asimismo, los hombres que reportaban múltiples parejas sexuales y que, además, tienen VPH, pueden ser vectores de tipos de alto riesgo y, por tanto, ser un medio de transmisión a sus respectivas parejas de VPH de alto riesgo³⁴. Este estudio, asimismo, indicaba que al número de parejas sexuales, se agregaban, la edad, el número de parejas sexuales en la vida y las recientes parejas sexuales³⁵, mientras que el VPH se asocia también con la historia sexual previa y los hábitos sexuales en las parejas de las mujeres con Condiloma³⁶.

En el mismo sentido antes mencionado, un estudio realizado en 11 países de cuatro continentes en población general de mujeres, indicaba que el número de parejas sexuales en la vida está asociado con el VPH, pero la relación no era lineal para los tipos 18, 31 y 33. Igualmente, además del número de parejas, se indicaba que las mujeres que tenían múltiples tipos de infección y un VPH de alto riesgo reportaban, un número mayor estadísticamente no significativo de parejas sexuales que aquellas mujeres que tenían una infección por un tipo de VPH de bajo riesgo³⁷. Otra pesquisa realizada en tres estados de la Ex Unión Soviética (Rusia, Bielorrusia y Latvia) en diversos tipos de pacientes (consultantes de ETS en centros, pacientes ginecológicos y aquellos/as que participaban de screening para cáncer cervical) indicaba que éstos se diferenciaban significativamente entre si, en una gran cantidad de variables, especialmente aquellas asociadas a hábitos sexuales, confirmando muchos de los hallazgos previamente mencionados. Por ejemplo, este estudio indicaba que además del número de parejas sexuales, tener ETS o no tener ETS previas y ser joven, incrementaba significativamente la probabilidad de riesgo al VPH, mientras que tener una pareja no fumadora y no tener pareja o tener al menos 1 durante los últimos 2 años, eran factores protectores. Asimismo, este estudio señala que los grupos VPH + y VPH - son claramente diferenciables por el mismo conjunto de variables identificadas como factores de riesgo del VPH y las neoplasias cervicales intraepiteliales en los países occidentales³⁸.

Además, las conductas sexuales están estrechamente ligadas a la seropositividad al VPH, pero no a la magnitud de la seroreactividad, lo que unido al incremento en el número de parejas sexuales, DNA positivo pasado ante el VPH 16 y diagnóstico actual citológico, estaban asociados con el VPH 16³⁹.

En cuanto al número de embarazos, las mujeres con hijos tenían menor riesgo de infección y el riesgo era menor entre mayor fuera el número de hijos. Asimismo, los resultados de este estudio revelan otras características relevantes para la alta prevalencia de infección por VPH como una asociación de la infección con factores sexuales como el número de compañeros sexuales, la carencia de compañero sexual habitual, la ausencia de hijos y el no uso de condón^{40, 41, 42}.

Por otra parte, algunos estudios han sugerido que si bien el VPH es una ETS, también, podría encontrarse en personas que aun no han iniciado su vida sexual. No obstante, un estudio hecho en Copenhague en personas vírgenes indicaba que el VPH⁴³ se encontraba sólo en aquellas mujeres que habían iniciado su vida sexual. Por ello, la literatura señala que la edad de inicio sexual es otra variable que está asociada con el VPH⁴⁴. No obstante, un conjunto de factores de riesgo conductuales (por ejemplo, el número de parejas sexuales en los últimos 6 meses, historia previa de ETS, uso de alcohol y drogas), y las características de la pareja sexual (como el número de parejas sexuales previas, variable antes mencionada) mediaban la asociación entre la edad de inicio sexual y la subsiguiente infección de VPH⁴⁵. Sin embargo, respecto a esta variable existen visiones contrapuestas, ya que un reciente estudio indicaba, asimismo, que la precocidad en el inicio de las relaciones sexuales no estaba relacionada con el VPH, mientras que las relaciones extramaritales de la pareja si estaban asociadas con el VPH de sus parejas. El mismo estudio muestra, también, un efecto tanto de la conducta sexual de la mujer como de la de su pareja en el VPH. Además, sugiere que existirían algunas diferencias en el patrón de asociación entre las conductas sexuales y los diferentes tipos de VPH⁴⁶.

El uso regular de condón está asociado con la reducción de riesgo oncogénico y VPH⁴⁷ aunque, un estudio sugiere que los condones no pueden prevenir la infección VPH, si bien, pueden proteger contra verrugas genitales (neoplasia cervical intrapitelial grado II o III⁴⁸).

La prevalencia del VPH en función de la edad, igualmente, varía extensamente⁴⁹. Una relación inversa entre la edad y VPH ha sido reportada en muchos países desarrollados, si bien, la información disponible sobre esta asociación es insuficiente en muchas otras partes del mundo. Según un reciente artículo, la prevalencia del VPH, estandarizado por edad, varía al comparar diversas poblaciones⁵⁰. Según este mismo estudio, el VPH logró su punto máximo debajo de los 25 o 35 años, decayendo con la edad en Italia, Países Bajos, España, Argentina, Corea y en Lampang, Tailandia y Ho Chi Minh, Vietnam, lo que no fue reportado en Songkla, Tailandia, ni Hanoi, Vietnam, donde el predominio del VPH era bajo en todas las categorías de edad. En otros países como Chile, Colombia y México, un segundo peak de VPH fue descubierto entre mujeres mayores. Este estudio concluye que las diferencias sustanciales observadas en las curvas específicas de edad entre diversas poblaciones tendría una variedad de

explicaciones⁵¹. Otro estudio efectuado en Canadá reportó que la mayor prevalencia del VPH se encontraba en mujeres jóvenes y que los factores de riesgo hallados insinuaban un modo sexual de transmisión del VPH⁵². Un hallazgo semejante determinaba que la presencia de DNA para el VPH estaba asociado con la corta edad o juventud, ser soltero/a, PAP previo o actual anormal y con una o más nuevas parejas sexuales en el último año o en los últimos 5 a 10 años, Así mismo, el VPH no estaba asociado con el nivel educacional, embarazos previos, uso actual o pasado de anticonceptivos o la edad al inicio sexual⁵³.

Otra variable mencionada por la literatura es la existencia de un diagnóstico de Condiloma, lo que unido al reporte de anomalías genitales de tipo dermatológico y la edad, predecían la presencia de VPH en mujeres⁵⁴.

Finalmente, la vulnerabilidad al VPH se asocia igualmente a una multiplicidad de variables demográficas, epidemiológicas y conductuales. Un estudio epidemiológico realizado en centros de ETS mostraba que el riesgo de adquirir una ETS (VPH) estaba asociado con: la edad (ser joven), múltiples variables demográficas, epidemiológicas y conductuales. Así, mientras la inmigración y el comercio sexual tenían el mayor impacto, la multiplicidad de parejas sexuales y el uso infrecuente de condón representaban un mayor riesgo. Asimismo, el diagnóstico y el rol terapéutico de los centros de ETS, así como un plan adecuado de información y prevención constituían factores protectores⁵⁵.

II. PREVALENCIA DE VPH EN AMÉRICA LATINA y CHILE

La prevalencia de VPH varía enormemente (entre el 2 % y casi el 30 %) ⁵⁶ y depende de si se estudia población general, población consultante de centros de ETS, población con lesiones malignas y ETS previas.

En una revisión sobre el tema⁵⁷ se señala que la prevalencia máxima de VPH cervical, estudiada por técnica de PCR, se presenta entre los 20 y 25 años de edad⁵⁸. Así, entre 10 - 20% de las mujeres VPH positivas en Cérvix presentan alteraciones citológicas; 20% de las mujeres jóvenes sin actividad sexual presentan VPH en cérvix y el 60% de las mujeres sexualmente activas^{59, 60}. Las mujeres con PAP (-) presentan una prevalencia de VPH variable entre 3,7 - 47,9% según método y población estudiada⁶¹ y 40 - 60% de los hombres cuyas parejas presentan VPH cervical tienen lesiones clínicas o subclínicas⁶².

En Chile, la prevalencia de la infección por VPH en población general de mujeres es de un 14,0%⁶³. Datos reportados en Chile por la última Encuesta Nacional de Salud (ENS), realizada el año 2003, confirman esta prevalencia previamente indicada, situándola en un 16% de la población femenina urbana⁶⁴.

Los estudios efectuados en Chile describen importantes diferencias entre los grupos de edad^{65, 66}. La mayor prevalencia se observa entre las mujeres más jóvenes, donde cerca de un 1/3 de las mujeres están infectadas con VPH.

Según estos mismos estudios previamente citados y mediante un análisis no paramétrico por edades simples, se sugiere una curva en J invertida para la prevalencia por edades, con el máximo (35%) en las edades menores y

prevalencias más bajas después de los 50 años donde se aplanan en torno al 10%^{67, 68}.

Considerando, los diversos niveles socioeconómicos, las prevalencias más bajas acontecieron en el nivel socioeconómico alto, no obstante, las diferencias con los otros niveles no alcanzan significación estadística. No obstante, según este mismo estudio, los resultados se transforman al considerar el nivel educacional: la menor prevalencia está en el bajo, aunque, al ajustar por edad, estas discrepancias no resultan significativas. Tampoco, hubo diferencias importantes ni significativas entre las mujeres de zonas urbanas y rurales.

La prevalencia reportada en Chile es similar a la descrita en otros países de América Latina: México, 14,5%⁶⁹, Costa Rica, 16,0%⁷⁰, Colombia (14,8%)⁷¹, Panamá (10%)⁷², pero más alta que en muchas partes de Europa^{73, 74, 75} y Asia^{76, 77, 78}.

En estudios realizados en Chile se han encontrado al menos 15 tipos de VPH de “alto riesgo” que corresponden a la mayoría de los tipos vinculados al CCU invasivo en el mundo^{79, 80} si bien, no se reportó los tipos 26, 68, y 82, ni tipos no clasificados. Estos resultados son comparables con los encontrados en otros países de América Latina⁸¹, salvo la presencia del tipo 56.

Respecto a la prevalencia de VPH reportada en CETS, las investigaciones indican que ésta es mayor que en población general. Un estudio efectuado en Suecia en clínicas de ETS mostraba que un 30.5% de los pacientes eran VPH positivos⁸². En otros países, por ejemplo, en Jamaica se reportaba que un 28.7% de las mujeres que se atendían en CETS eran VPH positivas⁸³. Específicamente, no se habían realizado pesquisas previas en Chile en pacientes consultante de centros de ETS.

Finalmente, en un estudio realizado en San Francisco, EEUU, se ha establecido que pacientes con VIH presentan prevalencias de VPH cervical entre 38 a 75%⁸⁴. Mujeres HIV positivas sintomáticas y recuentos de linfocitos CD4 bajos (< 200 cel/microlitro) tienen prevalencias de VPH cervical de 71%⁸⁵. Estas pacientes tienen un riesgo 2 veces mayor de presentar VPH de alto riesgo con una persistencia viral 2 veces mayor⁸⁶ y el 76% de las mujeres HIV positivas presentan infección por VPH anal.⁸⁷

III. GENOTIPOS

Los tipos de VPH varían según el tipo de población estudiada (población general, población consultante de ETS, población con ETS previas o con lesiones en tejidos) y región geográfica.

La mayor prevalencia de VPH de alto riesgo oncogénico tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59, se encuentra en África y América Latina⁸⁸. El VPH 16 es el más frecuente en el mundo, menos Indonesia y Argelia donde el VPH 18 es el más común. El tipo 45 presenta alta frecuencia en África Occidental, mientras que los tipos 33, 39 y 59 se concentran en Centroamérica y Sudamérica⁸⁹.

En población de trabajadoras sexuales, la seroprevalencia y detección de VPH, en cérvix tipos, 16, 18, 31 y 58 es de 14 y 10 veces mayor respecto población general⁹⁰.

Un estudio realizado en España⁹¹ indica que la positividad al VPH se incrementaba con el número de parejas sexuales en la vida en mujeres de población general. Sin embargo, este mismo estudio señalaba que en población de mujeres que ejercían el comercio sexual, el VPH estaba caracterizado por la alta multireactividad a 3 o 4 VPH (25%) a diferencia de la población general (3%), así como por una mayor frecuencia de respuesta en los anticuerpos al tipo 58 que en la población general. Además, aproximadamente, el 75 % de las mujeres seropositivas para el tipo 58 había sido nacido en un país latinoamericano. Asimismo, este estudio señala que la seroprevalencia de VPH en esta población era 10 veces más alto que observado en mujeres en la población general⁹².

En otro estudio realizado en Colombia se detectaron anticuerpos anti-VLP (Virus-Like Particles) en 82% de pacientes y en 56% de los controles. La detección de anticuerpos contra múltiples tipos de VPH fue generalizado; en pacientes jóvenes con CCU se observaron altos niveles de anticuerpos. Los resultados ratifican la alta tasa de infecciones por VPH en Colombia, tanto en pacientes con cáncer como entre población general, y las altas tasas de infección por los tipos virales 31 y 58⁹³. En otro estudio colombiano, se detectó una baja prevalencia de los tipos 6 -11 y alta de los tipos 16 -18 y 31 - 35, corroborándose una variación geográfica de la prevalencia de los diferentes tipos de VPH⁹⁴. Otro estudio efectuado en población general en Costa Rica indicaba que el tipo 16 se asociaba a la edad (18 – 24)⁹⁵. Por último, otro estudio mostraba que la prevalencia de tipos de “alto riesgo” y “bajo riesgo” era de 26.7% y 14.7% respectivamente⁹⁶ y otro estudio mostraba que la prevalencia de los tipos de “alto riesgo” era de 38.6% y los de “bajo riesgo” de 19.6%⁹⁷.

Una revisión reciente indica que existen variaciones regionales en la contribución hecha por los tipos de VPH al cáncer invasivo cervical (ICCU)⁹⁸. El tipo de VPH más común era el 16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 y 70. El VPH 16 era el tipo predominante (el 46-63 %), seguido de VPH 18 (10 - 14 %), 45 (2 - 8 %), 31 (2 - 7 %) y 33 (3 - 5 %) en todas las regiones, salvo Asia, donde VPH se describe el 58 (6 %) y el 52 (4 %)⁹⁹.

En otro estudio, la detección de VPH fue del 40 % en casos sin lesión histológica, del 88 % en lesiones de grado bajas, del 89 % en lesiones de estudios a nivel superior (HGL) y el 93.5 % en carcinoma invasiva. De todos los casos VPH positivos, el 89.5 % fue clasificado como el “alto riesgo” y sólo el 4.9 % de casos VPH era de tipo de “bajo riesgo”. El 6% de casos tenía múltiples infecciones. La distribución de genotipos viral fue: VPH33 (25.3 %), 16 (18.7 %), 52 (13.3 %), 31 (12 %), 35 (6.6 %), 18 (2.7 %). La mayor parte del VPH encontrado en biopsias era de genotipos de alto riesgo¹⁰⁰. Según estos hallazgos, la presencia elevada de alto riesgo VPH en pacientes sin lesiones cervicales puede ser un factor que explica el alto porcentaje de casos de CCU. Los tipos virales más comunes eran: VPH16, 31, 33 y 52¹⁰¹

ANÁLISIS DE DATOS

I. INTRODUCCIÓN

Este estudio se realizó en los seis Centros de ETS (CETS) de la Región Metropolitana ya que, concentran más del 50% de todas las atenciones por ETS que se realizan en el país y poseen la motivación, infraestructura y logística necesarias para un adecuado desarrollo de éste. Estos centros forman parte de una Red Asistencial del país y otorgan atención especializada en el nivel secundario de atención.

Es importante mencionar que los/as consultantes de todas las edades, diversidad de orientación sexual, y quienes ejercen el comercio sexual acceden al Centro en forma espontánea y/o por derivación desde otros establecimientos de la Red.

Los estudios de Laboratorio se efectuaron en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), centro de referencia de derivación nacional, en el marco del reforzamiento del nivel de resolutivez de la Autoridad Sanitaria en Salud.

Se espera que los resultados obtenidos constituyan un aporte a la adecuación de las políticas para la prevención de la adquisición del VPH, a fin de disminuir la incidencia de las lesiones condilomatosas y de la enfermedad a mediano plazo y como efecto a largo plazo, e impactar en la reducción de las tasas de mortalidad por cáncer cérvico-uterino y rectal.

Específicamente, el propósito del estudio es caracterizar la prevalencia de Virus Papiloma Humano (VPH) en los consultantes de ETS con diagnóstico de Condiloma Acuminado de los CETS de la Región Metropolitana mediante la genotipificación y asociación con variables de importancia epidemiológica.

Los objetivos generales son:

- 1.- Determinar los genotipos de VPH prevalentes en los consultantes con diagnóstico de Condiloma Acuminado de los CETS de la Región Metropolitana.
- 2.- Determinar los genotipos de VPH prevalentes en las personas que viven con VIH/SIDA, consultantes con diagnóstico de Condiloma Acuminado de los CETS de la Región Metropolitana.

Los objetivos específicos son:

- 1.- Confirmar el diagnóstico de infección por VPH en la totalidad de las muestras recibidas mediante PCR en tiempo real.
- 2.- Tipificar los casos positivos para VPH identificando los tipos VPH-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 y 56.

3.- Informar los resultados de la tipificación a los Centros de ETS participantes y a CONASIDA.

4.- Confeccionar un protocolo de manejo clínico de aquellas personas que resulten portadoras de un tipo de VPH asociado al desarrollo de algún tipo de cáncer.

5.- Redactar un informe final a partir de los resultados encontrados que incluya un análisis descriptivo de los hallazgos.

II. MÉTODO

El estudio fue transversalⁱⁱ o de prevalencia puntualⁱⁱⁱ de los genotipos de VPH en personas con diagnóstico de Condiloma Acuminado que consultaron en CETS y que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio (definidos por la CONASIDA) durante el mes de noviembre y diciembre del año 2005.

a.- Muestra

La muestra estuvo compuesta por 393 personas, todas ellas consultantes en Centros de ETS en los distintos Servicios de Salud de la ciudad de Santiago (SSM). Se eliminaron 3 casos por corresponder a muestras de tres personas ya analizadas o repetidas, quedando la muestra, finalmente, conformada por 390 casos válidos.

La población objetivo supuso como criterios de inclusión a personas con los siguientes requisitos:

- Diagnóstico de Condiloma Acuminado y lesiones Condilomatosas visibles en alguna de las siguientes localizaciones: pene, uretra, escroto, pubis, ano y zona perianal, vulva, vagina y boca.
- Que concurrieran por primera vez a los CETS, o a control por esta causa, entre el 10 de Noviembre y el 9 de Diciembre de 2005.^{iv}
- Que asistían a cualquiera de los seis CETS de la Región Metropolitana
 - Metropolitano Norte
 - Metropolitano Central
 - Metropolitano Oriente
 - Metropolitano Occidente
 - Metropolitano Sur
 - Metropolitano Sur - Oriente

ii El atributo seleccionado de la población o muestra poblacional se mide en un punto determinado del tiempo, en lo que es equivalente a tratar de obtener una "fotografía" del problema. Se busca conocer todos los casos de personas con una cierta condición en un momento dado, sin importar por cuánto tiempo mantendrán esta característica ni tampoco cuando la adquirieron.

iii Es la probabilidad de que un individuo sea un caso en un momento o edad determinada.

iv Esta era la fecha original pero la verdad es que se tomaron las muestras entre el 10 de noviembre y el 31 de enero 2006

b.- Cálculo del tamaño muestral

Partiendo de la hipótesis que los 10 genotipos de VPH estudiados se distribuirán normalmente en la muestra, con un nivel de confianza de 95% y una precisión del 2,5%, el cálculo muestral es el siguiente*:

Número de consultas promedio por centro en un mes	410
Porcentaje de consultas por Condiloma Acuminado por centro en un mes	60%
Número de consultas promedio por Condiloma Acuminado por centro en un mes	246
Población total a estudiar en los 6 centros en un mes	1476
Prevalencia esperada	10%
Precisión	2,5%
Nivel de confianza	95%
Tamaño muestral mínimo	482
Tamaño muestral corregido	500
Muestras a tomar por centro	84

* Cálculo efectuado con EPI INFO 6,04b

c.- Toma y envío de muestras

Las muestras fueron tomadas por Médicos, Matronas y Enfermeras, integrantes de los equipos de los seis CETS de la Región Metropolitana de acuerdo al siguiente protocolo:

Técnica de toma de muestra verrugas genitales o Condilomas¹⁰² (ver anexos):

- 1.- Tomar raspado del Condiloma.
- 2.- Introducir la muestra dentro de un tubo estéril, sumergiéndola en el medio de transporte MTV (Solución salina balanceada de Hank (pH 7,2-7,4) con seroalbúmina de bovino al 7,5%).
- 3.- Tapar inmediatamente el tubo, anotando la identificación de la muestra y del paciente, y guardarla en una caja transportadora con unidades refrigerantes hasta su traslado al Laboratorio Clínico. Si no es posible el transporte inmediato de las muestras al Laboratorio, se recomienda mantener las muestras refrigeradas (2-8 °C) por un máximo de 24 hrs.

Los tubos con medio de transporte fueron preparados por el ISP y CONASIDA los distribuyó a los CETS con anterioridad al inicio del período de la toma de muestras, luego, las muestras fueron enviadas al ISP acompañadas del "Formulario de envío de muestras al laboratorio" por los conductos que habitualmente se utilizan para el envío a este Centro de Referencia dentro de las 24 horas de haber sido tomadas.

Los exámenes moleculares, es decir, detección por PCR y genotipificación fueron realizados en el Sub departamento de Virología, Instituto de Salud Pública de

Chile. El ISP informó los resultados a los CETS correspondientes y a CONASIDA (ver anexos 3).

d.- Características de la muestra

Respecto a las características de la muestra, la edad promedio correspondió a 30,57 años con una desviación típica de 12,75. En cuanto al sexo se distribuyeron en 172 hombres (44,1%) y 218 mujeres (55,6%). En relación al Servicio de Salud (SS) al cual pertenecían las/os participantes, el mayor porcentaje correspondió al Servicio de Salud Norte (Hospital San José, SMSN) con un 21,4%, el resto de los servicios obtuvo porcentajes similares que fluctuaron entre el 18% y el 13%. Los porcentajes pueden ser observados en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Servicio de salud

SERVICIO DE SALUD	Frecuencia	Porcentaje
Oriente(Hospital Salvador)	56	14,3
Sur (Hospital Barros Luco)	53	13,5
Norte (Hospital San José)	84	21,4
Sur Oriente (Hospital Sótero del Río)	61	15,6
Central (Hospital San Borja Arriarán)	73	18,6
Occidente (Hospital San Juan de Dios)	65	16,6
Total	392	100,0

e.- Variables consideradas en el Estudio

La variable dependiente en el estudio fue tener VPH+. El resto de las variables fueron consideradas variables independientes para efecto de los diversos análisis estadísticos desarrollados.

Las variables disponibles para la realización de los diversos análisis fueron:

Relacionadas con la toma de muestra:

- Tipo de muestra,
- Localización,
- Fecha de toma de muestra.
- Relacionadas con el caso:

Generales:

- Identificación,
- Sexo,
- Edad,
- Síntomas,
- Fecha de inicio de síntomas,
- Diagnóstico clínico,
- Procedencia.

Antecedentes:

- ETS,
- Cáncer,
- Prácticas sexuales,

- Uso de preservativo,
- Orientación sexual,
- Ocupación,
- VIH,
- Etapa SIDA.

f.- Plan de Análisis Realizado

Se efectuó un análisis de tipo descriptivo usando el paquete estadístico SPSS, identificando los factores asociados a la prevalencia de los tipos de VPH encontrados:

- Análisis de frecuencias simples.
- Determinación de prevalencia con límites de confianza al 95%
- Análisis bivariado.
- Análisis multivariado (Regresión logística).

g.- Aspectos éticos

Para efectos de la identificación de las muestras se utilizó el mismo código vigente para VIH, ya que se protegió la identidad de los participantes para asegurar la confidencialidad, debido a que las ETS aún tienen fuertes connotaciones discriminatorias en la sociedad chilena.

Las personas fueron informadas acerca del estudio antes de la toma de muestras por el/la profesional tratante y manifestaron su acuerdo en un documento oficial de Consentimiento Informado donde se explicitaba la aceptación de participar en el estudio (ver anexo 2).

Se elaboró y utilizó un protocolo de manejo clínico para aquellas personas que resultaron portadoras de un tipo de VPH asociado según las evidencias científicas disponibles, a la aparición de algún tipo de cáncer.

h.- Dificultades del proceso

Las dificultades que se presentaron se relacionan con:

La recolección de la muestra: algunas situaciones ligadas a la demanda asistencial y menor disponibilidad de horas profesionales requirió extender el período de tiempo destinado a esta parte del Estudio.

La elaboración del Informe Final: a su vez, el mismo aspecto descrito anteriormente influyó en la demora en la elaboración de las bases de datos, en el análisis de resultados y elaboración del Informe Final.

SÍNTESIS DE RESULTADOS

Los resultados indican que existe una alta prevalencia de VPH (95%) en la población con diagnóstico de Condiloma Acuminado, consultante de los CETS en los servicios de salud de la ciudad de Santiago.

Los resultados indican que se encuentran VPH (-) en un 5.38% de la muestra y VPH (+) en un 94.62% de la muestra. Del total de VPH (+), se observa VPH (+) BR –bajo riesgo- (52,82%) y luego las AR –alto riesgo- (41.79%), tal como lo sugiere la evidencia internacional sobre el tema. Para ambos tipos de VPH (AR y BR), el porcentaje de personas infectadas tienden a disminuir hacia los tramos de edad superior.

Los genotipos de VPH más frecuentes fueron el 6 y 16, con 127 infecciones cada uno (32.6%), lo que llama la atención ya que estos genotipos no se observan en otros países.

Para esta población, la única variable importante relacionada tanto para la infección por VPH como para el genotipo sería la existencia de historia clínica de VIH, SIDA o alguna otra ETS, lo que es confirmado por los diversos tipos de análisis efectuados.

RESULTADOS

Del total de casos analizados (390), se encontraron 384 infecciones en 369 personas infectadas, lo que indica que hay personas con más de un genotipo de VPH. Estos casos se mencionan como “infección múltiple”.

Los resultados indican que se encuentran infección única VPH (+) BR (52,05%) y luego los VPH (+) infección única de AR (39,74%), tal como lo sugiere la evidencia internacional sobre el tema. Los tipos de VPH más frecuentes correspondieron a los genotipos 6 y 16 con 127 infecciones cada uno (32,6%), lo que llama la atención ya que estos genotipos no se observan en otros países (Las 127 infecciones incluyen las infecciones múltiples**).

La infección por VPH de Bajo Riesgo (BR) constituye el 52,82 % de la muestra (infección única y múltiple). La frecuencia del genotipo 6 correspondió a un 32,6% y la del genotipo 11, un 20,3%.

En cuanto a la infección por VPH de Alto Riesgo, ésta constituye el 41,79% de las infecciones por VPH (únicas y múltiples). El genotipo con mayor frecuencia correspondió al 16 con 127 infecciones (32,6% del total de infecciones) (Ver tabla N° 4). El resto de las infecciones en orden de frecuencia fueron, 18, 31, 39, 35, 33 y 56.

Tabla N° 4. Genotipos de VPH en consultantes de los CETS con Diagnóstico de Condiloma Acuminado

	Únicos		Múltiples		Totales	
	F.	%	F.	%	F.	%
VPH (-)					21	5,38
VPH (+)	358	91,79	11	2,82	369	94,62
VPH (+) BR	203	52,05	3	0,77	206	52,82
VPH (+) AR	155	39,74	8	2,05	163	41,79
Total					390	
Infecciones de bajo riesgo (BR)						
6	124	31,79	3	0,77	127**	32,56
11	79	20,26	0	0,00	79	20,26
Subtotal	203	52,05		0,00	206	52,82
Infecciones de alto riesgo (AR)						
16	125	32,05	2	0,51	127**	32,56
18	12	3,08	1	0,26	13	3,33
31	7	1,79	1	0,26	8	2,05
33	2	0,51	0	0	2	0,51
35	3	0,77	1	0,26	4	1,03
39	5	1,28	3	0,77	8	2,05
56	1	0,26	0	0	1	0,26
Sub total	155	39,74	8	2,05	163	41,79
Total	358	100%	11	2,82	369	41,79

En cuanto a la localización de la lesión, la mayor frecuencia de infecciones se observan en la zona perianal (33.8%), vulva (35.7%), pene (19.1%), localización múltiple (5,5%) y uretral (1,9%). Las demás localizaciones obtuvieron porcentajes inferiores a 1%. No se encontró relación entre la localización de la infección y el genotipo encontrado^v.

En la tabla N° 5 se pueden observar los resultados por genotipo y localización de la lesión.

Los porcentajes más importantes se encuentran en zona ano/perianal para los genotipos 6 y 16, y vulva para los genotipos 6, 11 y 16.

Tabla N° 5. Distribución porcentual de VPH por localización de la lesión ^{a, b}

Genotipo	Localización de la lesión								Total
	Pene	Uretra	Escroto/ pubis/ inguinal	Ano/ Perianal	Vulva	Vaginal	Boca	Múltiple (más de una)	
Negativo	1,1%			,8%	3,6%				5,5%
6	5,0%	,8%	,6%	11,9%	10,0%	,6%		3,0%	31,9%
6 - 31				,3%					,3%
6 - 39	,3%			,3%					,6%
11	5,3%	,3%	1,1%	6,1%	7,5%			1,1%	21,3%
16	5,3%	,6%	,6%	12,2%	11,4%	,8%	,3%	1,1%	32,1%
16 - 18					,3%				,3%
16 - 56				,3%					,3%
18	1,4%	,3%		,8%	,8%				3,3%
31	,8%			,3%	,6%				1,7%
33					,6%				,6%
35					,3%			,3%	,6%
35 - 39				,3%					,3%
39				,6%	,8%				1,4%
Total	19,1%	1,9%	2,2%	33,8%	35,7%	1,4%	,3%	5,5%	100,0%

^a Las casillas vacías indican ausencia de casos (0,0%).

^b Existe un 7,4% del total de casos (29 casos) que poseen un valor perdido en alguna de las dos variables ("Genotipo" y "Localización") y no fueron incluidos en el análisis (los resultados solo corresponden a los casos validos).

Se realizó un cálculo de frecuencias para las categorías de VPH construidas de acuerdo al grado de riesgo de las cepas de desarrollar cáncer cérvico-uterino. El grupo "bajo riesgo" (BR) está conformado por los genotipos 6 y 11, y el tipo "alto riesgo" (AR) conformado por los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39 y 56.

En cuanto al riesgo, los genotipos BR obtuvieron un porcentaje levemente mayor (56,7%).

Tabla N° 6. Frecuencias porcentual para tipo de VPH por "Bajo"/"Alto riesgo"

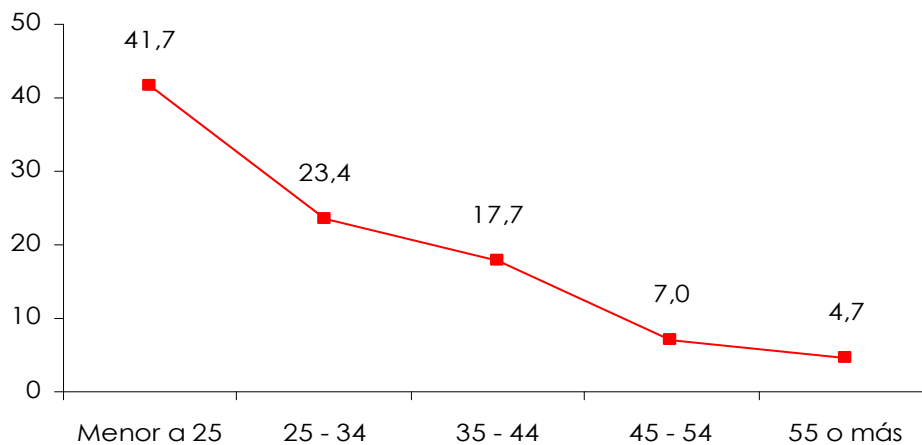
^v Ver mas adelante en análisis bivariado.

RIESGO	Personas portadoras	Porcentaje
Bajo riesgo	206	56,75 55.8
Alto riesgo	163	44,90 44.1
TOTAL	369	100

Se calculó la prevalencia puntual de (frecuencias de personas) VPH (+) ajustados por edad en seis grupos: <25, 25 – 34, 35 – 44, 45 – 54, 55 o más.

Se puede observar que la mayor prevalencia de VPH corresponden al rango de menor edad (<25 años) con una tendencia a la disminución en los tramos superiores (Ver Gráfico N° 1). La edad asociada a la mayor prevalencia corresponde al rango de menos de 25 años (41.7%), produciéndose una disminución en las edades superiores, 23,4% en el grupo de entre 25 y 35 años, 17,7% entre los 35 y 44 años, un 7% entre los 45 y 54 años y, finalmente, un 4,7% para el grupo de 55 años o más.

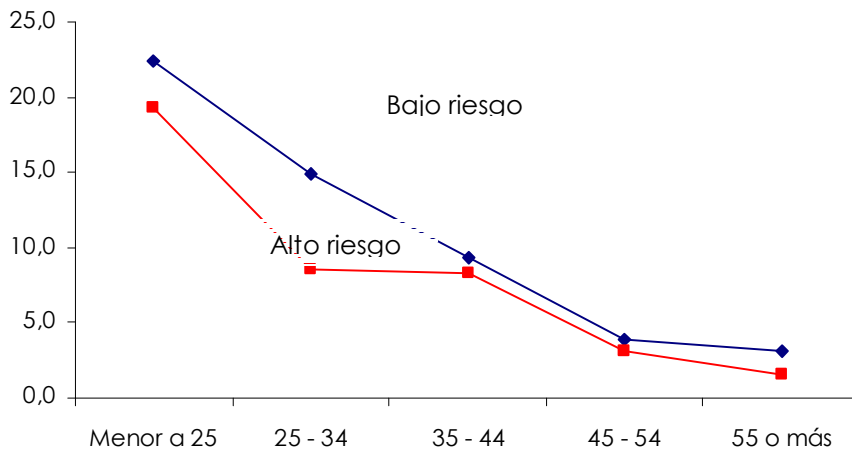
Gráfico N° 1. Porcentaje de personas VPH (+) por rango de edad*



* Los resultados están expresados en porcentajes del total de personas infectadas con el virus que corresponden a 384 personas

Al igual que para los resultados VPH (+) total, se calculó la prevalencia de VPH ajustados por edad para las cepas BR y AR. Los resultados se observan en el Gráfico N° 2.

Gráfico N° 2. Frecuencias de cepas AR y BR de VPH por rango de edad*

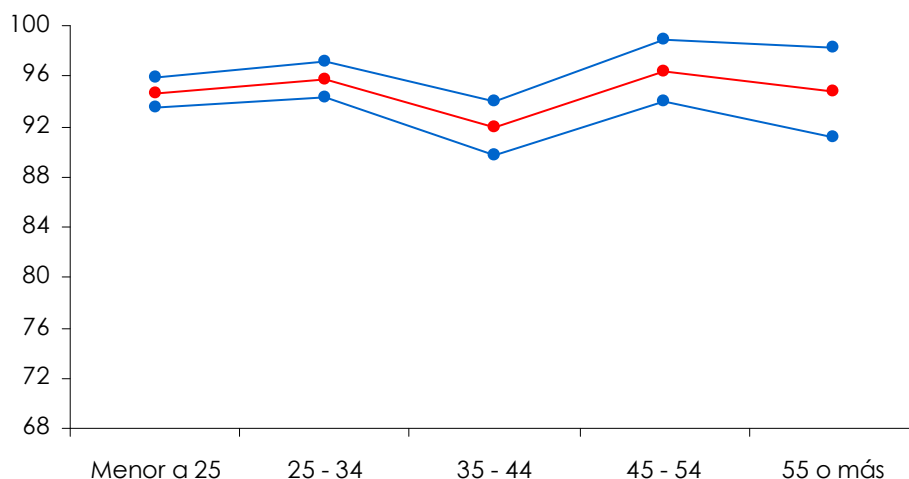


* Los resultados están expresados en porcentajes del total de personas infectadas con el virus que corresponden a 384 personas

Los resultados muestran la misma tendencia descrita anteriormente para el VPH-BR, es decir, existe una mayor prevalencia en los rangos de edad menores, con una progresiva disminución en los tramos de edad más avanzada. Para el VPH-AR se observa una tendencia similar con una considerable caída entre el primer y segundo tramo de edad.

Se calcularon los índices de prevalencia ajustados por edad para los 5 grupos definidos, mencionados anteriormente, además de sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Los resultados expresados en porcentaje se pueden observar en el Gráfico N° 3.

Gráfico N° 3. Porcentajes de personas infectadas por grupo de edad*



Los tramos de edad en donde se observa una mayor prevalencia corresponden a los grupos 25 – 34 y 45 – 54 con un 96% cada uno. El grupo de edad con menor prevalencia correspondió a 35 – 44 años con un 90%. Los

resultados no revelan una tendencia clara, no existen diferencias significativas en los porcentajes de cada uno de los grupos de edad.

Respecto a la existencia de antecedentes mórbidos el 72,9% de los sujetos no poseía antecedentes mórbidos relacionados, mientras que el 26,1% tiene antecedentes de otra (ETS, VIH o SIDA) y, finalmente, un 1% tiene antecedentes de Cáncer^{vi}. (Ver tabla N° 7)

Tabla N° 7. Distribución porcentual de Antecedentes Mórbidos Asociados

	Frecuencia	Porcentaje
ETS y/o VIH y/o SIDA	101	26,1
Cáncer	4	1,0
Sin antecedentes	282	72,9
Total	387	100,0
Perdidos Sistema	3	
Total	390	

Respecto del uso del condón, 134 personas (34.3%) refirió no usarlo nunca, de las cuales 47 personas (12% del total) refiere tener más de dos parejas. Del mismo modo, el 15.8% usa condón sólo en algunas situaciones aún refiriendo tener más de dos parejas (ver tabla N° 8).

Tabla N° 8. Distribución porcentual según uso de preservativo y numero de parejas

Uso de Preservativo	Numero de parejas			Total
	1 o menos	2	Más de 2	
Nunca	134 (4.3%)	20 (5.1%)	27 (6.9%)	181 (46.4%)
A veces	63 (16.1%)	26 (6.6%)	36 (9.2%)	125 (32.0%)
Siempre	39 (10.0%)	10 (2.5%)	22 (5.6%)	71 (18.2%)
Sin información	6 (1.5%)	1 (0.2%)	4 (1.0%)	11 (2.8%)
Total	242 (62,4%)	57 (14,7%)	89 (22,9%)	388 (100%)

La mayor proporción de personas refiere tener una pareja o menos (62,4%), contra un 37, 6% que mantiene más de dos parejas. Estos resultados son preocupantes considerando que la mayor proporción de personas que mantiene más de dos parejas, no usa preservativos regularmente (“Nunca” o “A veces”).

En relación al antecedente de tener pareja actual o anterior con Condiloma, los resultados se muestran en la tabla N° 9. Casi un 20% refiere tener pareja actual con historia de Condiloma y un 4,1% presenta antecedentes de parejas anteriores con historia de Condiloma. Por tanto, existe un 22,2% de personas que tienen antecedentes de Condiloma en pareja actual o pasada. El análisis Chi cuadrado indica una fuerte asociación entre estas dos variables ($X^2: 32,572 = p < 0,05$). Los resultados indican que tener antecedentes de pareja actual o pasada con Condiloma es determinante para adquirir la infección.

^{vi} Se hizo cálculos por genotipos y “ETS y VIH y SIDA” versus “Sin antecedes mórbidos”, sin embargo, no se encontró diferencias significativas.

Tabla N° 9. Antecedente de pareja actual y pareja anterior con Condiloma (Distribución porcentual)

Pareja actual con Condiloma	Pareja anterior con condiloma			Total
	Si	No	No sabe	
Si	5 (1,2%)	62 (15,9%)	9 (2,3%)	76 (19,5%)
No	10 (2,5%)	247 (63,6%)	32 (8,2%)	289 (74,5%)
No sabe	1 (0,2%)	10 (2,5%)	12 (3,0%)	23 (5,9%)
Total	16 (4,1%)	319 (82,2%)	53 (13,6%)	388

Se realizaron análisis bivariados (Chi-cuadrado) para determinar la asociación entre la presencia de VPH y algunas variables tales como edad, ocupación, orientación sexual, servicio de salud, localización de la lesión, presencia de historia de Condiloma en la pareja, número de parejas y uso de preservativo. Estos análisis tienen como objetivos el contraste de la hipótesis de que los dos criterios de clasificación (las dos variables categóricas incluidas en el análisis) son independientes. Si el estadístico de contraste posee una significación asociada inferior a 0.05, indica que existe dependencia o asociación entre las variables analizadas. En concreto, la pertenencia a una de las categorías de una de las variables está asociada a la pertenencia a una determinada categoría de la segunda variable. El análisis Chi-cuadrado se realizó para la presencia de VPH general y diferenciado para los tipos BR y AR.

La búsqueda de asociación se llevó a cabo con las variables indagadas en el estudio (sexo, edad, ocupación, orientación sexual, servicio de salud, localización de la lesión, presencia de historia de Condiloma en la pareja, número de parejas y uso de preservativo).

Para el caso de VPH total, sólo se encontró una relación significativa con la existencia de antecedentes de ETS anterior (X^2 ; 16,403= $P < 0.05$). Esto comprueba la existencia de asociación entre poseer VPH y tener antecedentes de ETS anterior.

Tabla N° 10. VPH por características seleccionadas en consultantes de CETS con Diagnóstico de Condiloma Acuminado

	VPH (-)	VPH (+)	%
SERVICIO DE SALUD			
Oriente	2	53	13,59
Sur	5	48	12,31
Norte	6	78	20,00
Sur Oriente	2	58	14,87
Central	4	63	16,15
Occidente	2	63	16,15
X^2 para servicio de salud 3.706= $P > 0.05$			
SEXO			
Hombre	7	172	44,10
Mujer	14	218	55,90
X^2 para sexo; 1,001= $P > 0.05$			
LOCALIZACION LESION			
Pene	4	65	16,67
Uretra	0	7	1,79
Escroto/pubis/inguinal	0	8	2,05
Ano / peri-anal	3	119	30,51

Vulva	13	116	29,74
Vaginal	0	5	1,28
Boca	0	1	0,26
Múltiple	0	20	5,13
X^2 para diagnóstico; 9,701= P> 0.05			
USO PRESERVATIVO			
Nunca	11	168	43,08
A veces	6	116	29,74
Siempre	2	68	17,44
Sin información	2	9	2,31
X^2 ; 4,569= P> 0.05			
ORIENTACION SEXUAL			
Heterosexual	16	268	68,72
Homo-bisexual ^{vii}	4	85	21,79
Sin información	1	8	2,05
X^2 ; 0,728= P> 0.05			
NUMERO DE PAREJAS SEXUALES			
1 o menos	13	228	58,46
2	3	54	13,85
Más de 2	5	79	20,26
X^2 ; 0,044= P> 0.05			
ANTECEDENTES MORBIDOS			
ETS y/o VIH y/o SIDA	3	96	24,62
Cáncer	2	2	0,51
Sin antecedentes	16	262	67,18
X^2 ; 16,403= P< 0.05**			
CONDILOMA PAREJA			
Si	3	72	18,46
No	16	268	68,72
No sabe	2	21	5,38
X^2 ; 0,787 P> 0.05			
CONDILOMA PAREJA ANTERIOR			
Si	1	15	3,85
No	17	296	75,90
No sabe	3	50	12,82
X^2 ; 0,23 P> 0.05			
OCUPACION			
Dueña de casa/Asesora	7	94	24,10
Trabajador sexual	0	8	2,05
Profesional/Ejecutivo	4	23	5,90
Obrero	6	116	29,74
Otro	1	14	3,59
Sin información	1	65	16,67
	19	320 ^{viii}	82,05
X^2 ; Para Condiloma pareja 7.367 P> 0.05			

Para el análisis bivariado por tipo de VPH (BR y AR), nuevamente se encontró asociación significativa con la variable “antecedentes mórbidos”. Este resultado comprueba la asociación entre tener VPH - AR y tener antecedentes de ETS (ver tabla N° 11).

^{vii} En esta categoría se encuentran agrupados las personas homosexuales, bisexuales y transexuales.

^{viii} Total de personas que respondieron esa pregunta.

Tabla N° 11. VPH Bajo y Alto riesgo y variables asociadas en consultantes de CETS con Diagnóstico de Condiloma Acuminado

Variables asociadas	Tipo de VPH por riesgo	
	X ² (Chi-cuadrado)	Significación
Sexo	X ² ; 0.223	p> 0.05
Servicio de salud	X ² ; 4.634	p> 0.05
Rango de edad	X ² ; 2.098	p> 0.05
Uso de preservativo	X ² ; 3.154	p> 0.05
Pareja con Condiloma	X ² ; 0.883	p> 0.05
Pareja anterior con Condiloma	X ² ; 1.240	p> 0.05
Numero de contactos	X ² ; 1.019	p> 0.05
Antecedentes	X ² ; 14.328	p< 0.05**
Diagnostico	X ² ; 8.087	p> 0.05

Con el fin de determinar si las variables asociadas indagadas (variables independientes) tienen influencia en conjunto sobre la infección por VPH (variable dependiente), se llevó a cabo un procedimiento de regresión logística^{ix} para comprobar si las variables asociadas poseen efecto sobre la infección por VPH y, al mismo tiempo, evaluar el nivel de este efecto.

La tabla N° 12 muestra información acerca de lo que ocurrirá cuando las variables independientes sean incorporadas al modelo; para cada variable incorporada al análisis, ofrece un contraste de la hipótesis nula de que los efectos de las variables son nulos. El poseer todas las variables una significación asociada superior a 0.05, indica que ninguna de las variables independientes contribuye significativamente a explicar la variable dependiente. En concreto, ninguna de las variables incorporadas en el análisis es capaz de predecir la infección por VPH.

Tabla N° 12. Variables que no están en la ecuación

Variables		Puntuación	gl	Sig.
	Edad	,300	1	,584
	Orientación sexual	,018	1	,893
	Parejas	,577	1	,448
	Ocupación	,143	1	,706
	Antecedentes mórbidos	,620	1	,431
	Pareja anterior con historia de Condiloma	,016	1	,900
	Pareja actual con historia de Condiloma	,633	1	,426
	Uso de preservativos	,249	1	,618
	Antecedentes	,094	1	,760
	Sexo	,176	1	,675
	Servicio de Salud	,369	1	,543
	Diagnostico	,001	1	,974
Estadísticos globales		6,029	13	,945

La tabla N° 13 muestra los niveles de significación asociados que contrastan la hipótesis nula de que el modelo no mejora con la inclusión de las variables independientes. Por tanto, se acepta la hipótesis nula de que la incorporación de

^{ix} La regresión logística tiene como objetivo predecir a partir de múltiples variables independientes (sean estas cuantitativas o nominales) una variables dependiente nominal (presencia /ausencia del atributo).

las variables independientes no mejora significativamente el ajuste, ni tampoco la capacidad predictiva del modelo.

Tabla N° 13. Pruebas ómnibus sobre los coeficientes del modelo

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	8,277	13	,825
	Bloque	8,277	13	,825
	Modelo	8,277	13	,825

La tabla N° 14 ofrece las estimaciones de los coeficientes del modelo (*B*) y los datos necesarios para valorar su significación. Esta significación se evalúa a partir del estadístico de *Wald* el cual, contrasta la hipótesis de que el coeficiente vale cero en la población.

Como es posible observar, casi todas las variables independientes, a excepción de *Antecedentes mórbidos (0.044)*, poseen significaciones estadísticas superiores a 0.05. Esto indica que al parecer la única variable importante a la hora de explicar la infección por VPH es la existencia de antecedentes mórbidos, aun que este efecto parece ser bastante débil. (No sería lo suficientemente importante para convertirse en una variable predictora).

Tabla N° 14. Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Edad	-,135	,219	,381	1	,537	,874
Orientación sexual	-,317	,620	,262	1	,609	,728
Número de parejas	,097	,541	,032	1	,857	1,102
Ocupación	-,003	,151	,000	1	,983	,997
Antecedentes mórbidos	-1,421	,704	4,072	1	,044	,242
Pareja anterior con historia de Condiloma	,203	,753	,073	1	,787	1,225
Pareja actual con historia de Condiloma	-,468	,576	,660	1	,417	,626
Uso de preservativo	,121	,391	,095	1	,758	1,128
Sexo	,179	,719	,062	1	,804	1,196
Servicio de salud	,087	,184	,223	1	,637	1,091
Diagnostico	,005	,093	,003	1	,957	1,005
Constante	1,623	2,563	,401	1	,527	5,068

En resumen, los resultados del análisis de regresión logística confirman los resultados encontrados en el análisis Chi-cuadrado del apartado anterior.

Es importante destacar que los resultados presentados deben ser interpretados desde las características de la muestra, (Consultantes por Condiloma de los Servicios de Salud de la ciudad de Santiago) no siendo representativa de la población nacional total.

DISCUSIÓN

Los hallazgos indican que la prevalencia de VPH en la población estudiada es alta comparada con población general (14%), lo que se debería a que las personas eran consultantes de ETS con diagnóstico de Condiloma.

Los resultados de este estudio indican que predominan los genotipos 6, 11 (BR) y 16 (AR) lo que ha sido reportado en otros estudios^{103, 104}. En esta investigación se reporta, también, la existencia de otros genotipos oncogénicos, que aunque su frecuencia es baja (18, 31, 33, 35, y 56) su presencia tiene implicaciones en términos de la prevención del CCU, sobre todo dada la próxima aprobación en Chile de dos vacunas que protegen contra los tipos 6, 11, 16, 18, (Gardasil y Cervarix).

A diferencia de otros estudios efectuados en otros países que indican como principal factor de riesgo al número de parejas sexuales durante la vida (lo que es consistente con la mayoría de los trabajos realizados en diferentes partes del mundo), este estudio indica que el principal factor de riesgo era los antecedentes mórbidos, lo que podría explicarse por el tipo de población investigada.

Además, en este estudio se observó la distribución por edad de la infección por VPH usando modelos no paramétricos. Para VPH+, la curva señala que el riesgo es máximo a las edades más jóvenes y luego cae en forma constante hasta aplanarse alrededor de los 40 años, lo que ha sido reportado previamente en otros estudios nacionales aunque en población general.

Igualmente, se requiere señalar, que dado el reciente desarrollo de vacunas contra los VPH de efecto profiláctico, terapéutico y combinado, se requería disponer de información actualizada sobre los genotipos existentes, su frecuencia y asociación con ciertas variables en población consultante de CETS. Lo anterior, ya que en Chile sólo existían estudios previos en población general. Por ello, dado que los resultados revelan que predominan algunos genotipos asociados a las vacunas que podrían introducirse en nuestro país, se realizó un cálculo de frecuencias para las categorías de VPH para las cuales está desarrollada vacuna. De esta forma, los subgrupos quedaron conformados por "Vacuna" (genotipos 6, 11, 16 y 18) y "No vacunas" (genotipos 31, 33, 35, 39 y 56).

Los resultados se pueden apreciar en la tabla N° 15. Se observa que en cuanto al riesgo, los genotipos BR obtuvo un porcentaje levemente mayor (56,8%) y que para la tipología vacuna/ no vacuna, la mayoría de las infecciones correspondieron al VPH tipo "Vacuna" (95%). Este hallazgo podría tener repercusiones a la hora de discutir la vacunación, si bien las vacunas sólo ayudan a prevenir el contagio y no tienen un efecto terapéutico. Sin embargo, dado su valor en la prevención primaria y la asociación existente entre VPH, condilomas y CCU, las vacunas podrían llegar a constituirse en un instrumento para la reducción de estas patologías.

Tabla N° 15. Frecuencias porcentual para genotipos de VPH por “Bajo”/”Alto riesgo” y Vacuna/No vacuna

	Frecuencia	Porcentaje
RIESGO		
Bajo riesgo	206	56,75
Alto riesgo	163	44,90
VACUNA / NO VACUNA		
No vacuna	18	4,96
Vacuna	345	95,04
TOTAL	363	100

Asimismo, se realizó un análisis de Chi-cuadrado para algunas variables (ver tabla N° 16). Se encontró relación estadística significativa con el sexo de los participantes y para antecedentes mórbidos. Esto asegura la fuerte asociación entre ser mujer y poseer antecedentes de ETS, con poseer los genotipos para los cuales se han desarrollado vacuna (genotipos, 11, 16 y 18).

Tabla N° 16. VPH “Vacuna” y “No Vacuna” y variables asociadas en población de personas con diagnóstico de Condiloma Acuminado consultantes de CETS

	Tipo de VPH por vacuna / no vacuna	
	X ² (Chi-cuadrado)	Significación
Sexo	X ² ; 6.873	p< 0.05
Servicio de salud	X ² ; 3.120	p> 0.05
Rango de edad	X ² ; 6.044	p> 0.05
Uso de preservativo	X ² ; 5.997	p> 0.05
Pareja con condiloma	X ² ; 1.341	p> 0.05
Pareja anterior con condiloma	X ² ; 3.343	p> 0.05
Numero de contactos	X ² ; 2.647	p> 0.05
Antecedentes	X ² ; 7.423	p< 0.05
Diagnostico	X ² ; 4.029	p> 0.05

En otro sentido, en la mayoría de los casos, las infecciones por VPH son subclínicas (fase latente) y es difícil detectarlas por examen citológico, histopatológico o por técnicas inmunohistoquímicas, aunque los resultados de este estudio efectuado en población consultante de CETS con diagnóstico de Condiloma revelan que el diagnóstico efectuado por los CETS es adecuado y acertado. Sin embargo, los métodos moleculares como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), aunque incrementan los costos y tiempos asociados, pueden constituirse en un apoyo y complemento a los programas de screening. No obstante, estas pruebas para la detección de VPH y los diversos genotipos se pueden usar como herramienta principal para la prevención del CCU. Por tanto, lo que hay que promover es la disminución del costo y la estandarización de los procedimientos. En ese sentido, este estudio propone un método basados en PCR que podría seguir usándose en el futuro.

Finalmente, si la infección por VPH es un precursor temprano de la neoplasia cervicouterina y, si estudios recientes en población de alto riesgo han demostrado que la adición del test de VPH a la citología cervical en el screening aumenta la sensibilidad en la detección de NIE de alto grado y cáncer cervicouterino¹⁰⁵. ¿Debería considerarse un test de tipificación de VPH en mujeres de alto riesgo?

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Los resultados del estudio indican que los genotipos de VPH más frecuentes en la población estudiada son el 6 y 16, con 127 infecciones cada uno (32.6%), sin embargo, llama la atención que la frecuencia de estos genotipos encontrados no coinciden con los hallazgos observados en otros países, lo que nos revela la importancia del presente Estudio. Así también, estos hallazgos sugieren profundizar en el futuro estos hallazgos, sobretodo pensando en la eventual relación entre algún genotipo no encontrado en otros países, pero si en Chile y su vinculación con el CCU. Por estas razones, resulta muy importante conocer los genotipos en mujeres con CCU en Chile. Asimismo, los hallazgos indican que se encuentran infección única VPH (+) BR (52,05%) y luego infección única de AR (39.74%), tal como lo sugiere la evidencia internacional sobre el tema.

También, los diversos análisis efectuados muestran que en esta población, la única variable importante relacionada tanto para la infección por VPH como para el genotipo sería la existencia de historia clínica de VIH, SIDA o alguna otra ETS, lo que es confirmado por los diversos tipos de análisis efectuados. Esto sugiere que el trabajo de los CETS, lugares donde asisten, se atienden y tratan estas personas, debe continuar y profundizar su labor tanto preventiva, como terapéutica.

Igualmente, considerando que la mayor prevalencia de VPH corresponden al rango de menor edad (<25 años) (con una tendencia a la disminución en los tramos superiores) sugieren focalizar la prevención de la infección por VPH en estos tramos de edad, labor que ha hecho y están haciendo los CETS.

Asimismo, se sugiere mantener y reforzar el diagnóstico precoz que se realiza a la población de riesgo en los CETS, especialmente, a través del control preventivo del PAP ya que este examen permite determinar en forma precoz las lesiones precancerosas, ya que según los resultados del estudio se encontró una relación entre ser mujer joven y VPH y según la evidencia disponible existe una fuerte asociación entre VPH y CCU.

Del mismo modo, se debería profundizar y ampliar las intervenciones preventivas, considerando las variables “numero de parejas sexuales” y “uso/no uso del condón”, ya que muchas de las personas estudiadas tienen un mayor número de parejas, mantiene más de dos parejas y no usa preservativos regularmente (“Nunca” o “A veces”) comparándolas con otro tipo de poblaciones.

También, es necesario considerar la historia sexual previa de los/as consultantes ya que los resultados indican que tener antecedentes de pareja actual o pasada con antecedente (o diagnóstico) de Condiloma es determinante en la adquisición de la infección.

Finalmente, con la información disponible de las diversas investigaciones, debiera discutirse el rol que podría jugar en este escenario descrito por el estudio el uso o no de las vacunas que próximamente estarán disponibles en el mercado nacional.

Anexo 1 Tablas de resultados

Características de la muestra

Tabla N° 1 Características de la muestra según Edad

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
EDAD	390	1	91	30,57	12,755
N válido (según lista)	390				

Tabla N° 2 Distribución porcentual de la muestra se gún Sexo

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
SEXO	Hombre	172	43,9	44,1
	Mujer	218	55,6	55,9
	Total	390	99,5	100,0
Perdidos	Sistema	2	,5	
Total		392	100,0	

Tabla N° 3 Distribución porcentual de la muestra se gún Servicio de salud

		Frecuencia	Porcentaje
SERVICIO	Oriente	56	14,3
DE SALUD	Sur	53	13,5
	Norte	84	21,4
	Sur Oriente	61	15,6
	Central	73	18,6
	Occidente	65	16,6
	Total	392	100,0

Tabla N° 4 Distribución según Número de parejas por uso de preservativo

		Numero de contactos			Total
		1 o menos	2	Más de 2	
Uso de preservativo	Nunca	134 (4.3%)	20 (5.1%)	27 (6.9%)	181 (46.4%)
	A veces	63 (16.1%)	26 (6.6%)	36 (9.2%)	125 (32.0%)
	Siempre	39 (10.0%)	10 (2.5%)	22 (5.6%)	71 (18.2%)
	Sin información	6 (1.5%)	1 (0.2%)	4 (1.0%)	11 (2.8%)
Total		242	57	89	388

Tabla N° 5 Distribución porcentual de la muestra según Ocupación

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	Dueña de casa/Asesora	104	26,7	30,1
	Trabajador sexual	8	2,1	2,3
	Profesional/Ejecutivo	28	7,2	8,1
	Obrero	124	31,8	35,9
	Otro	15	3,8	4,3
	Sin información	66	16,9	19,1
	Total	345	88,5	100,0
Perdidos	Sistema	45	11,5	
Total		390	100,0	

Tabla N° 6 Distribución porcentual de la muestra según Antecedentes mórbidos

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	ETS y/o VIH y/o SIDA	101	26,1
	Cancer	4	1,0
	Sin antecedentes	282	72,9
	Total	387	100,0
Perdidos	Sistema	3	
Total		390	

Tabla N° 7 Distribución porcentual de la muestra según edad por tramos

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Menor a 25	160	44,1	44,1	44,1
25 – 34	90	24,8	24,8	68,9
35 – 44	68	18,7	18,7	87,6
45 – 54	27	7,4	7,4	95,0
55 o más	18	5,0	5,0	100,0
Total	363	100,0	100,0	

Tabla N° 8 Distribución porcentual de la muestra según genotipos

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	Negativo	21	5,4	5,5	5,5
	6	124	31,6	32,3	37,8
	6 - 31	1	,3	,3	38,0
	6 - 39	2	,5	,5	38,5
	11	79	20,2	20,6	59,1
	16	125	31,9	32,6	91,7
	16 - 18	1	,3	,3	91,9
	16 - 56	1	,3	,3	92,2
	18	12	3,1	3,1	95,3
	31	7	1,8	1,8	97,1
	33	2	,5	,5	97,7
	35	3	,8	,8	98,4
	35 - 39	1	,3	,3	98,7
	39	5	1,3	1,3	100,0
	Total	384	98,0	100,0	
	Perdidos	Sistema	8	2,0	
Total		392	100,0		

Tabla N° 9 Distribución porcentual de la muestra según localización de la lesión

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	Pene	71	18,2	19,3
	Uretra	7	1,8	1,9
	Escroto/pubis/ing uinal	8	2,1	2,2
	Ano/perianal	124	31,8	33,8
	Vulva	131	33,6	35,7
	Vaginal	5	1,3	1,4
	Boca	1	,3	,3
	Múltiple	20	5,1	5,4
	Total	367	94,1	100,0
Perdidos	Sistema	23	5,9	
Total		390	100,0	

Anexo 2 Formularios usados por CONASIDA para realizar la investigación (Encuesta de comportamiento sexual y Consentimiento Informado)

Estudio de genotipificación de VPH.

Establecimiento _____

Formulario de envío CONASIDA

Parte A: (Usar calco)

Código del paciente:

					-								-			-		
--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	---	--	--	---	--	--

 Sexo

M	F
---	---

 Ficha o nº de paciente

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fecha de toma de muestra

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 Tipo de muestra: _____ biopsia de

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 Condiloma

_____ raspado de Condiloma
 Diagnóstico clínico _____
 Síntomas _____

Fecha de inicio de síntomas:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Parte D: Antecedentes Biopsicosociales

OCUPACIÓN	ANTECEDENTES PERSONALES DE:	RECONOCE HABER VISTO CONDILOMAS EN PAREJA ACTUAL		
Dueña de casa	Cáncer	SI		
Obrero u operario	Otras ETS	NO		
A. del hogar	VIH	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Nº CONTACTOS SEXUALES EN LOS ULTIMOS 12 MESES</td> <td> </td> </tr> </table>	Nº CONTACTOS SEXUALES EN LOS ULTIMOS 12 MESES	
Nº CONTACTOS SEXUALES EN LOS ULTIMOS 12 MESES				
Empleado	SIDA			
Estudiante	USO PRESERVATIVO	RECONOCE HABER VISTO CONDILOMAS EN PAREJAS ANTERIORES		
Profesional		SI		
Empresario		NO		
Ejecutivo				
Cesante	Siempre			
Trabajo sexual	ORIENTACIÓN SEXUAL DECLARADA			
Trabajo estacional (temporeros)		Heterosexual		
Transportista		Homosexual		
Trabajo agrícola		Bisexual		
Artista o artesano		Transgénero		
Ninguna				
Otra				

Estudio de genotipificación de VPH. Consentimiento Informado.

Yo, _____, he sido informado/a acerca de la realización del estudio "ESTUDIO DE GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN CONSULTANTES DE LOS CENTROS DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL CON DIAGNÓSTICO DE CONDILOMA ACUMINADO."

Como tengo diagnóstico de Condiloma Acuminado, causado por el Virus Papiloma Humano (VPH) he sido invitado/a a participar voluntariamente en este estudio, cuyo objetivo es definir los tipos de VPH que tienen las personas con Condiloma Acuminado y ver si están presentes en ellas algunos tipos de VPH cuya persistencia en el tiempo pudiera estar haya asociada a algún tipo de cáncer.

Mi participación consiste en que se me tomará una muestra del Condiloma, ya sea por raspado (que consiste en raspar la lesión con un objeto romo) o por biopsia (que consiste en sacar un trozo del Condiloma bajo anestesia local).

Se me ha informado que la obtención de la muestra puede provocar en un pequeño porcentaje de los casos (5%) dolor, sangrado, infección y en el caso de la biopsia también puede dejar una pequeña cicatriz.

Se me ha asegurado que mi nombre o número de carnet de identidad no se usarán en este estudio, todos mis datos serán tratados con confidencialidad y se me informará oportunamente del resultado del examen de genotipificación.

En caso de presentar algún tipo de VPH cuya persistencia en el tiempo se asocie a algún tipo de cáncer, se me ofrecerá la oportunidad de ser incluido/a en un protocolo especial de seguimiento y tratamiento.

Mi muestra sólo será utilizada para este estudio y no podrán realizársele otro tipo de pruebas, así como tampoco ser guardada para estudios posteriores.

Todos mis datos estarán codificados mediante claves que solo conocerá el investigador.

En caso de cualquier duda con respecto al Estudio puedo llamar a Carolina Peredo al número de teléfono: 6300677.

En caso de cualquier duda con respecto a los aspectos éticos del Estudio puedo llamar al Dr. Rodrigo Salinas al teléfono: 6300488.

En estas condiciones, acepto participar en el estudio.

Identificación y firma de el/la paciente.

Identificación y firma del profesional que toma la muestra.

Fecha:

CETS:

Debe quedar una copia de este documento en la ficha clínica y otra en poder del paciente.

Anexo 3 Informe sobre los material y métodos usados para la detección de VPH y Genotipificación

1.-TÉCNICA DE TOMA DE MUESTRA PARA PCR DE PAPILOMAVIRUS (VPH)

Materiales:

- 1.-Tórula con algodón estéril en un vástago de plástico de 15 cm de largo
- 2.-Medio de transporte viral (MTV): Solución salina balanceada de Hank (pH 7,2-7,4) con seroalbúmina de bovino al 7,5%.

Procedimiento:

- 1.- Tomar raspado del condiloma
2. Retirar la tórula y colocarla dentro de un tubo estéril, sumergiéndola en el medio de transporte MTV.
- 3.-Tapar inmediatamente el tubo, anotando la identificación de la muestra y del paciente, (CODIFICACIÓN) y guardarla en una caja transportadora con unidades refrigerantes hasta su traslado al Laboratorio Clínico. Si no es posible el transporte inmediato de las muestras al Laboratorio, se recomienda mantener las muestras refrigeradas (2-8 °C).

2.-PURIFICACIÓN DE DNA DE HPV A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS DE CONDILOMAS

1. Colocar 300-400 ml de medio de transporte de la muestra en un tubo Eppendorf limpio y esteril. Guardar el medio de transporte restante, junto a la punta de la tórula, a -70 ° C en otro tubo Eppendorf o criotubo limpio y esteril.
2. Centrifugar a 6.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
3. Eliminar el sobrenadante, cuidando no arrastrar el sedimento.
4. Agregar a cada tubo con sedimento 150 µl de buffer TNE, 10 µl de SDS (20%) y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar.
5. Incubar a 56°C (en baño María) por 30 minutos.
6. Agregar 200 µl de fenol y mezclar en un agitador por 2 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos a 4 °C.
8. Aspirar 150 µl de la fase superior (fase acuosa), traspasándolos a un tubo Eppendorf limpio y esteril. Tome la precaución de no aspirar la fase inferior (fase

^x Realizado por Dr. Eugenio Ramírez V.,

fenólica). Luego, adicionar 150 µl de mezcla afeol-cloroformo-alcohol isoamílico y mezclar en un agitador por 2 minutos a temperatura ambiente.

9. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos a 4 °C.

10. Aspirar 100 µl de la fase superior (fase acuosa), traspasándolos a un tubo Eppendorf limpio y esteril. Tome la precaución de no aspirar la fase inferior (fase fenol-cloroformo). Luego, agregar 100 µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar por 2 minutos a temperatura ambiente.

11. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos a 4 °C.

12. Aspirar 40-70 µl de la fase superior (fase acuosa), cuidando no arrastrar la fase inferior (cloroformo), colocándolo en un tubo Eppendorf limpio y esteril.

13. Congelar los tubos con muestras de DNA purificado a -20 °C para conservar hasta el momento de los análisis.

3.-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN GENÉRICA DEL DNA DE HPV

Preparación de reactivos.

Para realizar la técnica de PCR en tiempo real se utiliza el kit comercial LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, catálogo nº 12 239 264 001), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

1. Preparación del DNA master SYBR Green (Master mix).

1.1 Descongelar, protegiéndolo de la luz, un tubo 1B de tapa verde que contiene la mezcla de reacción concentrada (LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I 10x). Simultáneamente descongele un tubo 1A de tapa incolora que contienen la enzima (LightCycler FastStart Enzyme).

1.2 Agregar 10 µl del tubo 1A de tapa incolora (LightCycler FastStart Enzyme) en un tubo de 1B de tapa verde (LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green I 10x). La solución final estará constituida por Taq DNA Polimerasa, Buffer de reacción, dNTPs, (con dUTP en vez de dTTP), SYBR Green y MgCl₂ 10mM

1.3 Re-etiquetar el tubo 1B, que ahora contiene la enzima, con dos etiquetas verdes nuevas que son provistas en el kit. En el costado del tubo colocar la etiqueta, vial 1: LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I. Sobre la tapa del tubo colocar la etiqueta con el número 1. Siempre mantenga los tubos con "Master Mix" protegidos de la luz.

Preparación de la mezcla de reacción (Ver Anexo 1).

Nota: Esta actividad debe ser realizada dentro del gabinete de bioseguridad del AREA LIMPIA.

Identificar un tubo Eppendorf estéril de 0,5 ml como: Mezcla de reacción. Las cantidades señaladas a continuación es suficiente para una reacción de PCR en tiempo real, con un volumen final de 10 μ l. se recomienda preparar suficiente mezcla de reacción para el n° total de reacciones más una adicional.

Agregar 6,8 μ l de H₂O del kit al tubo Mezcla de reacción.

Agregar 0,6 μ l de MgCl₂ [25 mM] del kit. La concentración final para un volumen de reacción de 10 μ l será de 3,75 mM

Agregar 0,3 μ l de cada uno de los partidores MY09 y MY11 ([20 μ M] que corresponde a una dilución 1/10 del stock madre nuevo) o agregar 0,3 μ l de la dilución 1/20 del stock de los partidores antiguos. La concentración final para cada partidor en un volumen de 10 μ l de reacción será de 0,6 μ M

Agregar 1 μ l de Master mix.

Homogenizar la solución con pipeteos suaves y repetitivos.

Colocar el n° necesario de capilares nuevos, dentro de una gradilla fría o en el termobloque refrigerante para cada reacción (con el adaptador para centrifuga Light Cyler, Roche catálogo N° 1 909 312), de acuerdo al n° total de reacciones.

Tomar 9 μ l de volumen de mezcla de reacción y colocarlos en un capilar de reacción. Posteriormente tapar cada capilar con las tapas correspondientes que suministra el kit.

Cargado de las muestras (AREA SUCIA)

Nota: Esta actividad debe ser realizada dentro del gabinete de bioseguridad del AREA LIMPIA.

Una vez dosificado la Mezcla de reacción en los capilares, agregar 1 μ l de DNA de cada muestra en un capilar distinto, sin olvidar de agregar 1 control positivo y un control negativo por cada ensayo o corrida.

Tapar cuidadosamente cada capilar, cuidando no tocar la boca o el interior de los capilares.

Tomar el adaptador correspondiente a cada capilar y centrifugar 30 segundos a 1500 rpm.

Mantener los capilares protegidos de la luz y refrigerados hasta el momento de hacer el PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real.

Encender el computador del Equipote PCR en tiempo real (ingresar clave: lightcyler).

Encender el termociclador en tiempo real (Light Cyler)

En la pantalla del computador se desplegará el escritorio. Pinchar con el mouse sobre ícono del programa: LightCyler3 Front Screen.

Pinchar la opción RUN (se desplegará una ventana de mayor tamaño).

Pinchar la opción: OPEN EXPERIMENT FILE.

Ir a la carpeta: Mis documentos/Marcelo LCyC/VPH, y pinchar el archivo: hpv genéricos 280704. Apretar la tecla: Enter, aceptando este archivo.

Aceptar el autochequeo, si eventualmente el equipo consulta por esto.

Chequear cuidadosamente cada uno de los datos ingresados al ensayo, como constitución del programa (hot start, PCR, Melting Curve, Cooling), Temperaturas, Tiempos en cada ciclo, Número de ciclos, Tasa de transición de temperaturas. Ver y comparar datos con ANEXO 2.

Pinchar la opción: EDIT SAMPLE, y: a.- Identificar las muestras a examinar. Cada muestra se ingresa al protocolo con el número rotulado en la muestra extraída, posteriormente el blanco de extracción y finalmente el control positivo. b.- seleccionar el Maximun Position (nº de determinaciones de la corrida). c.-una vez terminada la identificación, pinchar la opción: DONE.

Pinchar opción RUN

El equipo desplegará una pantalla que da la opción de guardar los resultados (Do you want to save the experiment?). Pinchar opción: Sí. Identificar el nombre del archivo como: hpv genéricos, nº de protocolo y 6 dígitos de la fecha. Este archivo se guardará en la siguiente ruta: data/users/Usuario/Eugenio. Guardar el archivo. Pinchar la opción: DONE.

Se iniciará el autochequeo del equipo. Si el equipo no reconoce todos los capilares, seguir la siguiente secuencia: a.-golpear suavemente el carrusel o mover los capilares que no fueron reconocidos, b.-pinchar RUN, c.-volver al paso 23 (identificar el archivo). Si guarda el nuevo archivo con el mismo nombre y el equipo señala que el archivo existe, responda: Sí, d.-se iniciará nuevamente el autochequeo del equipo.

Si el equipo detecta OK (exitosamente) a todos los capilares, se iniciará realmente el PCR en tiempo real en forma automática.

Se desplegará una ventana que muestra una gráfica del nivel de fluorescencia para cada una de las muestras (gráfico de barras), otro gráfico mostrará las fluctuaciones de temperatura del protocolo y otra gráfica que muestra los niveles de fluorescencia para cada muestra a medida que pasa en tiempo (gráfico lineal)

El equipo realizará los siguientes procesos:

Chequeo de los capilares.

Amplificación.

Hot Start.

PCR.

Melting Curve.

Cooling.

Finalización del programa.

4.-GENOTIPIFICACIÓN DE VPH MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Para la genotipificación de VPH mediante PCR en tiempo real se usó esencialmente el mismo protocolo señalado en "PCR en tiempo real para DNA de VPH con partidores genéricos", pero con partidores en combinaciones específicas (Tabla 1).

Tabla 1
Características de partidores y amplicón para genotipificación de VPH mediante PCR en tiempo real

Genotipo VPH	Partidor 1	Partidor 2	Tamaño amplicón (bp)	Tm amplicón (°C)
6	MY09	MYB12 *	358	83,8
11	MY09	MYB13 *	356	83,7
16	MY09	MYO14 **	107	79,7
18	MY09	WDB74 *	108	80,7
31	MY09	WDB128 *	355	82,2
33	MY09	MYB16 *	360	81,8
35	MY09	MYB115 *	361	82,8
39	MY09	MYB89 *	358	83,7
45	MY09	MYB69 *	106	80,6
56	MY09	MYB197***	130	82,8

* Referencia nº 3, ** Referencia nº 2, *** Referencia nº 7

En primer lugar, mediante los ensayos de PCR en tiempo real se determinó presencia o ausencia de amplicón. En segundo lugar, se determinó la especificidad del amplicón por el análisis de la curva de meeting, determinando el melting point del amplicón. Finalmente, mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se determinó el tamaño del amplicón.

Los resultados obtenidos en la tipificación por PCR en tiempo real permiten agrupar los genotipos estudiados en 5 grupos diferentes de acuerdo al Melting Point, y en 3 grupos basado en el tamaño del amplicón (Tabla 2 y 3). Se consideró un genotipo VPH no tipificable, aquellas muestras que dieron un resultado positivo por PCR con partidores genéricos y negativo con todas las combinaciones de partidores (10) específicos.

Tabla 2. Grupos determinados por análisis del meeting point en PCR en tiempo real

Meeting Point (°C)	VPH	Código
< 80	16	A
≥ 80 - < 81	18, 45	B
≥ 81 - < 82	33	C
≥ 82 - < 83	31, 35, 56	D
≥ 83	6,11,39	E

Tabla 3. Grupos determinados por análisis del tamaño del amplicón por electroforesis en geles de agarosa

Tamaño Amplicón (bp)	VPH	Código
106 - 108	16, 18, 45	F
130	56	G
355 - 361	6, 11, 31, 33, 35, 39	H

5.-GENOTIPIFICACIÓN DE VPH MEDIANTE ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para la genotipificación de VPH mediante el tratamiento de los amplicones o productos de PCR con enzimas de restricción se realizó de acuerdo a protocolos previamente publicados (referencia nº 2). Para este análisis los amplicones obtenidos con el PCR genérico fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción Ddel y Rsal. Los fragmentos de restricción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (tabla 4).

Tabla 4. Fragmentos de restricción con Ddel y Rsal de los diferentes genotipos de VPH

Geno tipo	Tamaño de fragmentos (bp) con Enzima Ddel							Tamaño de fragmentos (bp) con Enzima Rsal								
VPH-6		38				6					161	149	72/67			
		2				7										
VPH-11	44								2		216		135	72	26	
	7															
VPH-16	45									310				72/70		
	2															
VPH-18	43								2				135/125	85/72	38	
	2								3							
VPH-31				28	16				2	380				72		
				3	7											
VPH-33			32			7	5	3				236		102	72	39
			0			7	2	3								
VPH-35				29	13			2					177/161		72	42
				4	5			3								
VPH-39			32		13							260		123	72	
			4		1											
VPH-45			32		13					338					72	45
			4		1											
VPH-56			30		14						310				72	
			7		2											

De acuerdo a los resultados de los perfiles de movilidad electroforética de los fragmentos de restricción, los genotipos de VPH 5 clases con la enzima de restricción Ddel y en 4 clases con la enzima Rsal (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Grupos de VPH determinados por análisis de restricción con enzima Ddel

Perfil de restricción	VPH	Código
1	6	I
2	11, 16, 18	J
3	31, 35	K
4	33	L
5	39, 45,56	M

Tabla 6. Grupos de VPH determinados por análisis de restricción con enzima RsaI

Perfil de restricción	VPH	Código
1	31	O
2	16, 45, 56	P
3	11, 33, 39	Q
4	6, 18, 35	R

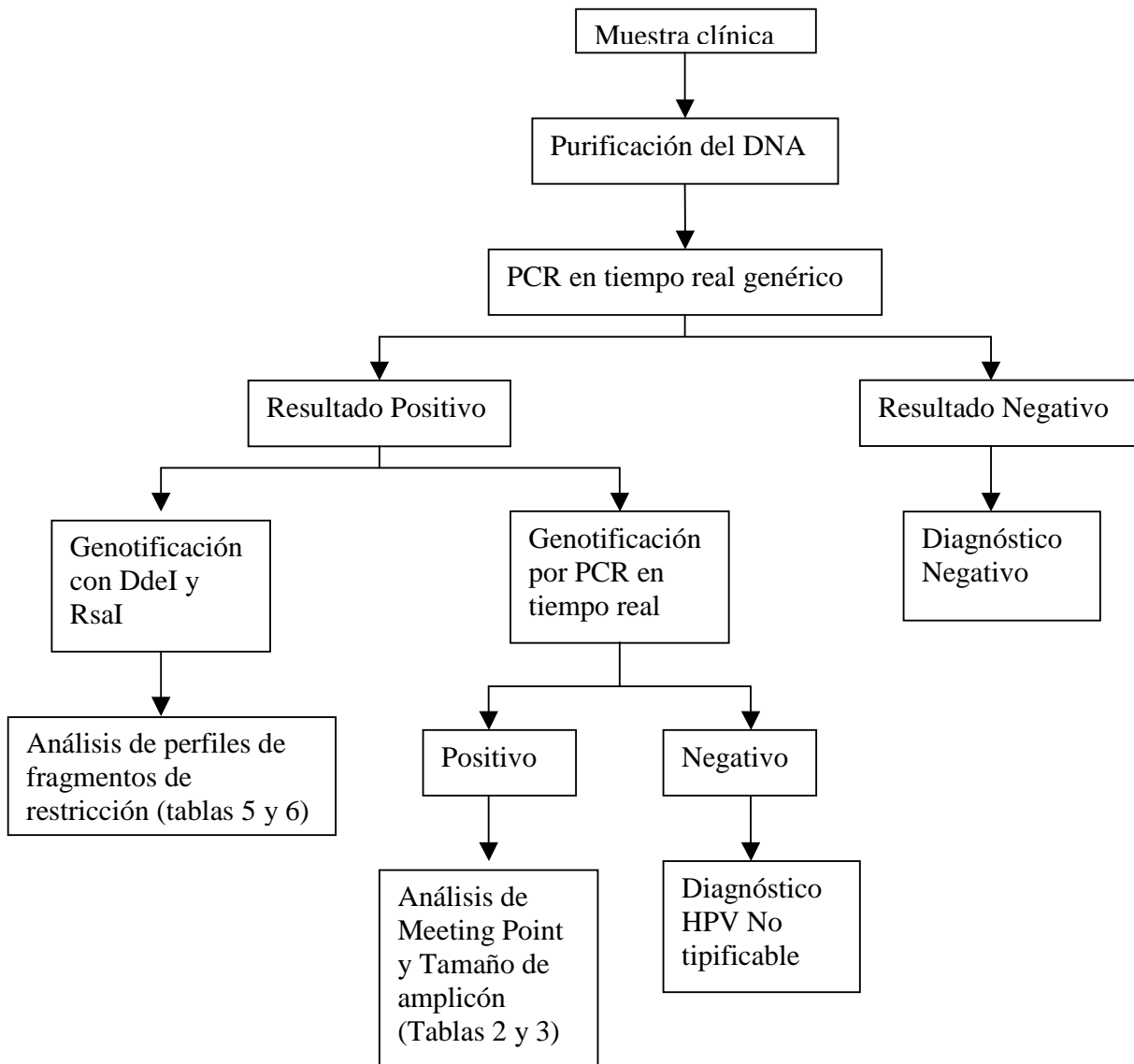
6.-INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo el esquema experimental diseñado en este estudio (Figura 1), una muestra fue considerada positiva y negativa para DNA de VPH cuando arrojó un resultado positivo o negativo por PCR en tiempo real con partidores genéricos, respectivamente. Los productos de amplificación (amplicones) de las muestras positivas fueron digeridos, por separado, con las enzimas de restricción Ddel y RsaI; y se analizaron sus perfiles de restricción (tablas 2 y 3). Adicionalmente, todas las muestras positivas fueron analizadas por un segundo PCR con combinaciones específicas de partidores para los 10 genotipos diferentes de VPH. Las muestras que arrojaron un resultado negativo por el segundo PCR se consideraron como VPH no tipificables. En las muestras con resultados positivos se analizó en melting point y el tamaño del amplicón (tablas 5 y 6). El análisis simultáneo de los resultados obtenidos con los ensayos de enzimas de restricción y el PCR en tiempo real determinó diferentes combinaciones de ellos para cada uno de los 10 genotipos de VPH estudiados (tabla 7).

Tabla 7. Combinación de resultados para la genotipificación de VPH

Genotipo VPH	Resultados			
	Melting Point	Tamaño Amplicón	Ddel	RsaI
6	E	H	I	R
11	E	H	J	Q
16	A	F	J	P
18	B	F	J	R
31	D	H	K	O
33	C	H	L	Q
35	D	H	K	R
39	E	H	M	Q
45	B	F	M	P
56	D	G	M	P

Figura 1. Algoritmo de Diagnóstico y Genotipificación de VPH



Referencias de esta sección

- 1.- Kawasaki ES. "Sample Preparation from blood, cells, and other fluids". Capítulo 18, páginas 146-152. En "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Editores: Innis M, Gelfand D, Sninsky J y White Th. Academic Press, Inc, San Diego California, 1990.
- 2.- Ting Y y Manos M. "Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses". Capítulo 42, páginas 356-367. En "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Editores: Innis M, Gelfand D, Sninsky J y White Th. Academic Press, Inc, San Diego California, 1990.
- 3.- Bauer H y Manos M. "Detection of genital Human Papillomavirus". Capítulo 2.17, páginas 407-413. En "Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications", Editores: Persing D, Smith Th, Tenover F y Whyte Th. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993.
- 4.- Gravitt P y cols. "A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation". Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention 12: 477-484, 2003.
- 5.- Janet R. Kornegay, y cols. "International Proficiency Study of a Consensus L1 PCR Assay for the Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA: Evaluation of Accuracy and Intralaboratory and Interlaboratory Agreement". Journal of Clinical Microbiology 41: 1080–1086, 2003.
- 6.- Gravitt P y cols. "Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses". Journal of Clinical Microbiology 38: 357-361, 2000.
- 7.- Gravitt P y cols. "Genotyping of 27 Human Papillomavirus Types by Using L1 Consensus PCR Products by a Single-Hybridization, Reverse Line Blot Detection Method". Journal of Clinical Microbiology 36: 3020–3027, 1998.
- 8.-Protocolo de Purificación de DNA. Adaptado de protocolo descrito en Laboratorio de Biología Molecular, Dr. E. Durigon, Brasil, 2005.

Protocolo de amplificación mediante Light Cyler para HPV con partidores genéricos.

Preparación del Master Mix

Se recomienda utilizar la tabla 1 para preparación de master mix.

Reactivos	Reacción 10 µl (1X)	Conc.final	Rango recomendado
H ₂ O	6,8		
MgCl ₂	0,6	3,75 mM	1 a 5mM
MY09 (20 µM)	0,3	0,6 µM	0,3 a 1,0 µm
MY11 (20 µM)	0,3	0,6 µM	0,3 a 1,0 µm
Master Mix	1,0		
Total	9µl		
Muestra	1,0µl		
V final	10µl		

Tabla 1

2. Proceso de amplificación (ciclos en el termociclador).

El programa de amplificación se describe en el PC (Equipo de Light Cyler), Carpeta Mis documentos/Marcelo LCY/HPV/HPVGenéricos

Protocolo de amplificación.

Experimental Protocol

Program: hotstart								Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode				
1	95	600	20	0	0	0	None				

Program: pcr								Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode				
1	95	10	20	0	0	0	None				
2	55	5	20	0	0	0	None				
3	72	20	20	0	0	0	Single				

Program: meltingcurves								Type:	Melting Curves	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode				
1	95	0	20	0	0	0	None				
2	65	15	20	0	0	0	None				
3	95	0	0.1	0	0	0	Continuous				

Program: cooling								Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode				
1	40	30	20	0	0	0	None				

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Eymín, G. & Fich, F. (2003) Enfermedades de Transmisión Sexual. En: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/TemasMedicinaInterna/pdf/EnfTransmisionSexual.pdf>
- ² Brown D., Shew, M., Qadadri, B., Neptune, N., Vargas, M., Tu, W., Juliar, B., Breen, T., & Fortenberry J. (2005). A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis*, 15, 191 (2), 182 - 192.
- ³ Dunne, E., Nielson, C., Stone, K., Markowitz, L., & Giuliano, A. (2006) Prevalence of HPV Infection among Men: A Systematic Review of the Literature. *Infect Dis*. 15,194, 1044-1057.
- ⁴ Tjalma, W., Harbin, M., Pavoneen, J., van Waes, T.S. et al. (2004). Prophylactic HPV vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *Intr. J Gynecol Cancer*, 14 (5), 751-761.
- ⁵ De Francesco, M., Gargiulo, F., Schreiber, C., Ciravolo, G., et al. (2005). Detection and genotyping of human papillomavirus in cervical smears from Italian patients. *J. Med Virol*, 75, (4), 588-592.
- ⁶ Eymín, G. & Fich, F. (2003) Enfermedades de Transmisión Sexual. En: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/TemasMedicinaInterna/pdf/EnfTransmisionSexual.pdf>
- ⁷ Muñoz, N., Bosh, F., Sanjosé, S., Herrero, R., et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-527.
- ⁸ Ferreccio, C., Prado, R., Luzoro, A., Ampuero, S., Snijders, P., Meijer, C., Vaccarella, S., Jara, A., Puschel, K., Robles, S., Herrero, R., Franceschi, S., & Ojeda, J. (2004) Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (12), 2271-2276.
- ⁹ Grettell, L, Diego, B., & de Jesús, O. (2005) Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino *Rev. cuba. obstet. ginecol*, 31, (1).
- ¹⁰ Franceschi, S. (2005) The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res*, 166, 277-297.
- ¹¹ Ibid.
- ¹² Ibid.
- ¹³ Muñoz, N. & Bosch, X. (1996) Relación causal entre virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino y consecuencias para la prevención. *Bol Oficina Sanit Panam*, 121 (6), 550-566.
- ¹⁴ Parikh, S.; Brennan, P., & Boffetta, P. (2003). Meta-analysis of social inequality and the risk of cervical cancer. *Int J Cancer*, 10, 105, 687-691.

-
- ¹⁵ DEIS (2004). Unidad de Cáncer, Minsal
- ¹⁶ Schiappacasse, V., Vidal, P., Casas, L., Dides, C., & Díaz, S. (2003) *Chile: situación de la salud y los derechos sexuales y reproductivos*. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva (ICMER)/Corporación de Salud y Políticas Sociales (CORSAPS): Santiago, Chile.
- ¹⁷ Guía Clínica Cáncer Cérvico uterino (2005) Unidad de Cáncer, depto Epidemiología, Minsal.
- ¹⁸ Donoso, E., Cuello, M., & Villarroel, L. (2006). Reducción de la mortalidad por cáncer cérvico uterino en Chile, 1990-2003. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 71, (5), 307-312.
- ¹⁹ Schiappacasse, V., Vidal, P., Casas, L., Dides, C., & Díaz, S. (2003) *Chile: situación de la salud y los derechos sexuales y reproductivos*. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva (ICMER)/Corporación de Salud y Políticas Sociales (CORSAPS): Santiago, Chile.
- ²⁰ Ibid.
- ²¹ Eymin, G. & Fich, F. (2003) Enfermedades de Transmisión Sexual. En: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/TemasMedicinaInterna/pdf/EnfTransmisionSexual.pdf>
- ²² Ibid.
- ²³ Grce, M., Husnjak, K., Skerlev, M., Lipozencic, J., & Pavelic, K. (2000) Detection and typing of human papillomaviruses by means of polymerase chain reaction and fragment length polymorphism in male genital lesions. *Anticancer Res.*, 20 (3B):2097-102.
- ²⁴ Menton, M., Neeser, E., Oettling, G., Marzusch, K., Smyczek-Gargya, G. (1992) [Colposcopy, histology, cytology and HPV findings in patients with condylomata of the vulva] [Article in German] *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 52 (8):471-4.
- ²⁵ Yun, K., Joblin, L. (1992) Presence of human papillomavirus DNA in condylomata acuminata in children and adolescents. *Pathology*, 25 (1):1-3.
- ²⁶ Costa, S., Syrjanen, S., Vendra, C., Chang, F., Guida, G., Tervahauta, A., Hippelainen, M., & Syrjanen, K. (1992) Detection of human papillomavirus infections in the male sexual partners of women attending an STD clinic in Bologna. *Int J STD AIDS*, 3(5):338-46.
- ²⁷ Nabi, S., Trimeche, M., Ziadi, S., BaCCUouche, D., Amara, K., Mestiri, S., Hmissa, S., Gaddas, N., Mokni, M., Toumi, I., & Korbi, S. 2006 [Prevalence of high risk oncogen HPV by in situ hybridization and by PCR in condyloma acuminata in the region of the Tunisian Center] [Article in French] *Tunis Med.*, 84 (3):170-6.
- ²⁸ Clifford, G., Gonçalves, M., & Franceschi, S. (2006) Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS*, 20 (18), 2337-2344.
- ²⁹ Karlsson, R., Jonsson, M., Edlund, K., Evander, M., Gustavsson, A., Boden, E., Rylander, E., & Wadell, G (1995) Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 22 (2), 119-127.

-
- ³⁰ Wieland, U, & Pfister, H. (1997) Papillomavirus in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. En: Gross G, Barrasso R. (1997) Human Papilloma Virus Infection (pp. 1-16). Alemania: Editorial Ullstein Mosby.
- ³¹ Franco, E., Villa, L., Ruiz, A, & Costa, M. (1995) Transmission of cervical human Papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. *J Infect Dis*, 172, 756-763.
- ³² Grettell, L, Diego, B., & de Jesús, O. (2005) Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino *Rev. cuba. obstet. ginecol*, 31, (1).
- ³³ Oviedo, G., Arpaia, A., Ratia, E., Seco, N., Rodriguez, I., & Ramírez, Z. (2004) Factores de riesgo en mujeres con infección del virus papiloma humano. *Rev. chil. obstet. ginecol*, 69 (5), 343 - 346.
- ³⁴ Bosch, F., Castellsague, X., Munoz, N., de Sanjose, S., Ghaffari, A., Gonzalez, L., Gili, M., Izzarugaza, I., Viladiu, P., Navarro, C., Vergara, A., Ascunce, N., Guerrero. E., & Shah, K. (1996) Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst*, 7, 88 (15), 1060- 1067.
- ³⁵ Peyton, C., Gravitt, P., Hunt, W., Hundley, R., Zhao, M, Apple, RJ, & Wheeler C. (2001) Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis*, 183 (11), 1554-1564.
- ³⁶ Rotola, A., Costa, S., Monini, P., Vendra, C., Guida, G., Terzano, P., Di Luca, D., Martinelli, G., & Cassai, E. (1994) Impact of sexual habits on the clinical evaluation of male HPV infection. *Eur J Epidemiol*, 10 (4), 373-380.
- ³⁷ Vaccarella, S., Franceschi, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P., Clifford, G., Smith, J., Lazcano-Ponce, E., Sukvirach, S., Shin, H., de Sanjose, S., Molano, M., Matos, E., Ferreccio, C., Anh, P., Thomas, J., Meijer, C. & IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2006). Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (2), 326 - 333.
- ³⁸ Syrjanen, S., Shabalova, I., Petrovichev, N., Kozachenko, V., Zakharova, T., Pajanidi, J., Podistov, J., Chemeris, G., Sozaeva, L., Lipova, E., Tsidaeva, I., Ivanchenko, O., Pshepurko, A., Zakharenko, S., Nerovjna, R., Kljukina, L., Erokhina, O., Branovskaja, M., Nikitina, M., Grujnberga, V., Grujnberg, A., Juschenko, A., Johansson, B., Tosi, P., Cintonino, M., Santopietro, R., Syrjanen, K. (2003) Sexual habits and human papillomavirus infection among females in three New Independent States of the former Soviet Union. *Sex Transm Dis*, 30 (9), 680-684.
- ³⁹ Castle, P., Shields, T., Kirnbauer, R., Manos, M., Burk, R., Glass, A., Scott, D., Sherman, M., & Schiffman, M. (2002) Sexual behavior, human papillomavirus type 16 (HPV 16) infection, and HPV 16 seropositivity. *Sex Transm Dis*, 29, (3), 182-187.
- ⁴⁰ Bauer, H., Hildesheim, A., Schiffman, M., et al. (1993) Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis*, 20, 274-278.

-
- ⁴¹ Burk, R., Nelly, P., Feldman, J., Bromberg, J., Vermund, S., Dehovitz, J., & Landesman, S. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*, 23, 333-341.
- ⁴² Bravo, M., Medina, O., Melgarejo, D., & Serrano, M., (2004) Infección por virus del papiloma humano en una muestra de mujeres jóvenes con citología normal. *Rev. colomb. cancerol*, 8 (2), 5-10.
- ⁴³ Kjaer, S., Chackerian, B., van den Brule, A., Svare, E., Paull, G., Walbomers, J., Schiller, J., Bock, J., Sherman, M., Lowy, D., & Meijer, C. (2001) High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10 (2), 101-106.
- ⁴⁴ Rivera., R., Aguilera, J. & Larrain, A. (2002) Epidemiología del virus papiloma humano (hvp). *Rev. chil. obstet. ginecol.*, 67, 6, 501-506.
- ⁴⁵ Kahn, J., Rosenthal, S., Succop, P., Ho, G., & Burk, R. (2002) Mediators of the association between age of first sexual intercourse and subsequent human papillomavirus infection. *Pediatrics*, 109, (1).
- ⁴⁶ Vaccarella, S., Franceschi, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P., Clifford, G., Smith, J., Lazcano-Ponce, E., Sukvirach, S., Shin, H., de Sanjose, S., Molano, M., Matos, E., Ferreccio, C., Anh, P., Thomas, J., Meijer, C. & IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2006). Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15 (2), 326 - 333.
- ⁴⁷ Baldwin, S., Wallace, D., Papenfuss, M., Abrahamsen, M., Vaught, L., & Giuliano, A. (2004) Condom use and other factors affecting penile human papillomavirus detection in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis*, 31(10), 601-607
- ⁴⁸ Manhart, L., & Koutsky, L. (2002). Do condoms prevent genital HPV infection, external genital warts, or cervical neoplasia? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*, 29,725-735.
- ⁴⁹ Franceschi, S. (2005) The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res*, 166, 277-297.
- ⁵⁰ Franceschi, S. , Herrero, R. , Clifford, G. , Snijders, P. , Arslan, A. , Anh, P. , Bosch, F. , Ferreccio , C., Hieu, N. , Lazcano-Ponce, E. , Matos, E. , Molano, M. , Qiao, Y., Rajkumar, R. , Ronco, G. , de Sanjosé, S. , Shin, H , Sukvirach, S. , Thomas, J. , Meijer , C., & Muñoz, N. (2006). Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer*, 119 (11), 2677-2684.
- ⁵¹ Ibid.
- ⁵² Sellors, J., Mahony, J., Kaczorowski, J., Lytwyn, A., Bangura, H., Chong, S., Lorincz, A., Dalby, D., Janjusevic, V., & Keller J. (2000) Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ*, 5, 163 (5), 503-508.
- ⁵³ Fairley, C., Chen, S., Ugoni, A., Tabrizi, S., Forbes, A., & Garland, S. (1994) Human papillomavirus infection and ETS relationship to recent and distant sexual partners. *Obstet Gynecol*, 84 (5), 755-759.

-
- ⁵⁴ Van Doornum, G., Prins, M., Juffermans, L., Hooykaas, C., van den Hoek J., Coutinho, R., & Quint W. (1994) Regional distribution and incidence of human papillomavirus infections among heterosexual men and women with multiple sexual partners: a prospective study. *Genitourin Med*, 70 (4), 240-246.
- ⁵⁵ Manfredi, R., Beltrami, C., D'Antuono, A., Chiodo, F., & Varotti, C. (2001) [Sexually transmitted diseases (STD) and their relationship with sexual behaviour and condom use, in a cohort of teenagers referring to a STD centre. A nine-year, prospective study] *Infez Med*, 9 (3), 147-153.
- ⁵⁶ Franceschi, S. (2005) The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res*, 166, 277-297
- ⁵⁷ Rivera., R., Aguilera, J. & Larrain, A. (2002) Epidemiologia del virus papiloma humano (hvp). *Rev. chil. obstet. ginecol.*, 67, 6, 501-506.
- ⁵⁸ Wieland U, Pfister H. Papillomavirus in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. Chapter 1. In: Gross G, Barrasso R. Human Papilloma Virus Infection. Alemania: Editorial Ullstein Mosby 1997; 1-16.
- ⁵⁹ Ibid.
- ⁶⁰ Ley, C., Reingold, A., & Schiffman, M. (1991) Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *N Natl Cancer Inst*, 83, 997-1003.
- ⁶¹ Wieland U, Pfister H. Papillomavirus in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. Chapter 1. In: Gross G, Barrasso R. Human Papilloma Virus Infection. Alemania: Editorial Ullstein Mosby 1997; 1-16.
- ⁶² Rosenberg, S., Greenberg, M., & Reid, R. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infection in men. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 14, 495-512.
- ⁶³ Ferreccio, C., Prado, R., Luzoro, A., Ampuero, S., Snijders, P., Meijer, C., VaCCUarella, S., Jara, A., Puschel, K., Robles, S., Herrero, R., Franceschi, S., & Ojeda, J. (2004) Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (12), 2271-2276
- ⁶⁴ MINSAL & PUC (2005) *Encuesta nacional de salud chile 2003. Enfermedades transmisibles: prevalencia de virus de hepatitis, hantavirus y virus del papiloma humano.* (Informe corregido). Santiago, Chile.
- ⁶⁵ Ibid.
- ⁶⁶ Ferreccio, C., Prado, R., Luzoro, A., Ampuero, S., Snijders, P., Meijer, C., VaCCUarella, S., Jara, A., Puschel, K., Robles, S., Herrero, R., Franceschi, S., & Ojeda, J. (2004) Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (12), 2271-2276
- ⁶⁷ Ibid.

-
- ⁶⁸ MINSAL & PUC (2005) *Encuesta nacional de salud Chile 2003. Enfermedades transmisibles: prevalencia de virus de hepatitis, hantavirus y virus del papiloma humano*. (Informe corregido). Santiago, Chile
- ⁶⁹ Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., Muñoz, N., et al. (2001) Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer*, 91, 412-420.
- ⁷⁰ Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., et al. (2000) Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Ins*, 15, 92 (6), 464-474.
- ⁷¹ Molano, M., Posso, H., Weiderpass, E., et al. (2002) Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer*, 87, 324-333.
- ⁷² De Britton, R., Reeves, W., Brenes, M., & Rawls, W. (1993) Infección por el virus del papiloma humano en la mujer adulta de Panamá. *Rev. méd. Panamá*, 18 (1), 28-35.
- ⁷³ Jacobs, M., Walboomers, J., Snijders, P., Voorhorst, F., Verheuen, R., Franssen-Daalmeijer, N., & Meijer, C. (2000) Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*, 87, 221-227.
- ⁷⁴ Sanjosé, S., Alnirall, R., Lloveras, B., et al. (2003) Cervical human papillomavirus infections in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis*, 30, 788-793.
- ⁷⁵ Karlsson, R., Jonsson, M., Edlund, K., Evander, M., Gustavsson, A., Boden, E., Rylander, E., & Wadell, G (1995) Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 22 (2), 119-127.
- ⁷⁶ Anh, P., Hieu, N., Herrero, R, et al. (2003) Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer*, 104, 213-220.
- ⁷⁷ Sukvirach, S., Smith, J., Tunsakul, S., et al. (2003) Population-based human papillomavirus prevalence in Lampang and Songkla, Thailand. *J Infect Dis*, 187, 1246-1256.
- ⁷⁸ Li, L., Dai, M., Clifford, G., Yao, W., Arslan, A., Li, N., Shi, J., Snijders, P., Meijer, C., Qiao, Y., & Franceschi, S. (2006) Human papillomavirus infection in Shenyang City, People's Republic of China: a population-based study. *Br J Cancer*, 95 (11), 1593-1597.
- ⁷⁹ Muñoz, N., Bosh, F., Sanjosé, S., Herrero, R., et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-527.
- ⁸⁰ Anh, P., Hieu, N., Herrero, R, et al. (2003) Human papillomavirus infection among women in South and North Vietnam. *Int J Cancer*, 104, 213-220.
- ⁸¹ Ferreccio, C., Prado, R., Luzoro, A., Ampuero, S., Snijders, P., Meijer, C., VaCCUarella, S., Jara, A., Puschel, K., Robles, S., Herrero, R., Franceschi, S., & Ojeda, J. (2004) Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13 (12), 2271-2276.

-
- ⁸² Strand, A., Rylander, E., Evander, M., & Wadell, G. (1993) Genital human papillomavirus infection among patients attending an STD clinic. *Genitourin Med*, 69 (6), 446-449
- ⁸³ Figueroa, J., Ward, E., Luthi, T., Vermund, S., Brathwaite, A., & Burk, R. (1995) Prevalence of human papillomavirus among STD clinic attenders in Jamaica: association of younger age and increased sexual activity. *Sex Transm Dis*, 22 (2), 114-118.
- ⁸⁴ Wieland U, Pfister H. Papillomavirus in human pathology: Epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. Chapter 1. In: Gross G, Barrasso R. Human Papilloma Virus Infection. Alemania: Editorial Ullstein Mosby 1997; 1-16.
- ⁸⁵ Ibid.
- ⁸⁶ Ahdieh, L., Klein, R., Burk, R., Cu-Uvin, S., Schuman, P., Duerr, A., Safaeian, M., Astemborski, J., & Daniel, R. (2001) Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV) - positive and HIV-negative women. *J Infect Dis*, 184 (6) 682-690.
- ⁸⁷ Palefsky, J., Holly, E., Ralston, M., Da Costa, M., & Greeblatt, R. (2001) Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus (HIV) positive and high_ risk HIV-negative women. *J Infect Dis*, 183 (3), 383-391.
- ⁸⁸ Rivera., R., Aguilera, J. & Larrain, A. (2002) Epidemiologia del virus papiloma humano (hpv). *Rev. chil. obstet. ginecol.*, 67, 6, 501-506.
- ⁸⁹ Jastreboff, A., & Cymet, T. (2002) Role of human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Rev Postgrad Med J*, 78, 225-228.
- ⁹⁰ Touze, A., de Sanjose, S., Coursaget, P., Almirall, M., Palacio, V., Meijer, C., Kornegay, J., & Bosch, F. (2001) Prevalence of anti-human papillomavirus type 16, 18, 31, and 58 virus-like particles in women in the general population and in prostitutes. *J Clin Microbiol*, 39 (12), 4344 - 4348.
- ⁹¹ Ibid.
- ⁹² Ibid.
- ⁹³ Cómbita, A., Touzé, A., Coursaget, P., & Bravo, M. (2003) Respuesta serológica a las cápsides de los papilomavirus oncogénicos tipos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 en mujeres Colombianas con cáncer de cervix. *Rev. colomb. cancerol*, 7 (1), 26-34.
- ⁹⁴ Urdaneta, H., Calderón, O., & Amórtegui, A. (1994) Prevalencia de los genotipos del virus del papiloma humano en neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervical en Bogotá. *Rev. colomb. obstet. ginecol*, 45 (3), 219-224.
- ⁹⁵ Wang, S., Schiffman, M., Herrero, R., Carreon, J., Hildesheim, A., Rodriguez, A., Bratti, M., Sherman, M., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Clayman, B., Burk, R., & Viscidi, R. (2004) Determinants of human papillomavirus 16 serological conversion and persistence in a population-based cohort of 10 000 women in Costa Rica. *Br J Cancer*, 91 (7), 1269 - 1274.

⁹⁶ Peyton, C., Gravitt, P., Hunt, W., Hundley, R., Zhao, M, Apple, RJ, & Wheeler C. (2001) Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis*, 183 (11), 1554-1564.

⁹⁷ Brown, D, Legge, D., & Qadadri, B. (2002) Distribution of human papillomavirus types in cervicovaginal washings from women evaluated in a sexually transmitted diseases clinic. *Sex Transm Dis*, 29 (12), 763-768.

⁹⁸ Clifford, G., Rana, R., Franceschi, S., Smith, J., Gough, G., & Pimenta, J. (2005) Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 1157-1164.

⁹⁹ Ibid.

¹⁰⁰ Melo, A., Montenegro, S., Hooper, T., Capurro, I., Roa, J., & Roa, I. (2003). Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. (2003) *Rev Méd Chile*, 131, 1382-1390.

¹⁰¹ Ibid.

¹⁰² Kawasaki, E. (1990). Sample preparation from blood, cells, and other fluids (pp. 146-152). En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California.

103 Muñoz, N., & Bosch, FX. (1996) The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ*. 30 (4):362-77.

104 Clifford, G., Smith, J., Plummer, M., Muñoz, N. & Franceschi, S. (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 88, 63-73.

105 Serman, F. (2002) Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil obstet ginecol*, 67(4) ,318-323.