



Revista Científica Ciencia Médica

ISSN: 1817-7433

ISSN: 2220-2234

revista_cienciamedica@hotmail.com

Universidad Mayor de San Simón

Bolivia

Bonifaz Pérez, Diego; Rocabado Calizaya, Omar
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS VPH ONCOGÉNICOS
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS TAQMAN
Revista Científica Ciencia Médica, vol. 23, núm. 2, 2020, -Junio, pp. 122-128
Universidad Mayor de San Simón
Bolivia

DOI: <https://doi.org/10.51581/rccm.v23i2.74>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426064022002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UDEM [redalyc.org](https://www.redalyc.org)

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS VPH ONCOGÉNICOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS TAQMAN

MOLECULAR IDENTIFICATION OF ONCOGENIC HPV BY REAL TIME PCR WITH TAQMAN PROBES

Diego Bonifaz Pérez¹, Omar Rocabado Calizaya²

RESUMEN

Introducción: Los Virus del Papiloma Humano (VPH) constituyen un diverso grupo de virus, siendo los genotipos 16 y 18 los más prevalentes y, por lo tanto, principales objetivos de varios estudios en infecciones del tracto anogenital. El presente estudio pretende determinar la infección por VPH de Alto Riesgo en muestras genitales, mediante la aplicación de tecnología molecular para la genotipificación de VPH16 y VPH18 por PCR en Tiempo Real. **Materiales y Métodos:** Se trabajó con 151 muestras de hisopados genitales, las extracciones de ADN se realizaron mediante columnas de sílice y la identificación de los VPH de Alto Riesgo fue mediante la optimización de una PCR en Tiempo Real duplex para la genotipificación de VPH16 y 18, para lo cual se realizó el diseño de cebadores y sondas TaqMan® por software especializado, y se determinó las concentraciones de reactivos y temperaturas de reacción ideales. **Resultados:** En la identificación de los VPH de Alto Riesgo se obtuvo un total de 41 casos positivos, muestras que fueron seleccionadas para realizar la genotipificación de VPH16 y VPH18 mediante la técnica de PCR en Tiempo Real. La mayor presencia de estos virus oncogénicos se determinó en mujeres de 15 a 29 años (40% y 26,7% respectivamente). **Conclusión:** Mediante la optimización e implementación de nuevas técnicas moleculares se pretende mejorar el seguimiento epidemiológico sobre la presencia de los VPH de Alto Riesgo y así proporcionar una mejor guía sobre la diseminación y presencia de los distintos genotipos oncogénicos de VPH en nuestra población.

ABSTRACT

Introduction: Human Papillomavirus (HPV) constitute a diverse group of viruses, being genotypes 16 and 18 the most prevalent and main objectives of several studies on anogenital tract infections. The present study intends to determine the High Risk HPV infection in genital samples, through the application of molecular technology for the genotyping of HPV16 and HPV18 by Real Time PCR. **Materials and methods:** We worked with 151 samples of genital swabs where DNA extractions were performed using silica columns and the identification of High Risk HPV was through the optimization of a duplex real-time PCR for genotyping of HPV16 and 18, for which primers and TaqMan® probes were designed by specialized software, and ideal reagent concentrations and reaction temperatures were determined. **Results:** In the identification of HPV High Risk, a total of 41 positive cases were obtained. These samples were selected to perform genotyping of HPV16 and HPV18 using the Real Time PCR technique. The greater presence of these oncogenic viruses was determined in women aged 15 to 29 years (40% and 26.7% respectively). **Conclusion:** Through the optimization and implementation of new molecular techniques, it is intended to improve the epidemiological follow-up on the presence of High Risk HPV and thus provide a better guide on the dissemination and presence of the different oncogenic HPV genotypes in our population.

INTRODUCCIÓN

Los Virus del Papiloma Humano (VPH) constituyen un diverso grupo de virus ADN (Ácido desoxirribonucleico), género en el cual existen aproximadamente 45 genotipos que están involucrados en infecciones del tracto anogenital. Desde el punto de vista de su asociación con el cáncer cervical, los VPH pueden clasificarse como: VPH de alto riesgo y VPH de bajo riesgo¹. Dentro del grupo de alto riesgo

los genotipos 16 y 18 son los más prevalentes², siendo estos, el principal objetivo de varios estudios epidemiológicos así como del desarrollo de vacunas³.

En la actualidad, las técnicas de detección y genotipificación de los VPH utilizan herramientas moleculares como el ensayo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real en la cual la detección y cuantificación

¹ Máster en Medicina Tropical y Salud Internacional. Laboratorio de Biología Molecular, Caja Nacional de Salud
² Laboratorio de Genética, Labogen SRL.

Correspondencia a:

Nombre: Diego Bonifaz Pérez
 Correo: diego.bonifazperez@yahoo.com
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1987-9011>
 Telf. y celular: +(591) 77559439

Palabras clave: Papillomaviridae, PCR Tiempo Real, Cáncer Cervical

Keywords: Papillomaviridae, Real Time PCR, Cervical Cancer

Procedencia y arbitraje: no comisionado, sometido a arbitraje externo.

Recibido para publicación: 23 septiembre 2019

Aceptado para publicación: 22 diciembre 2020

Citar como:

Bonifaz D, Rocabado O. Identificación Molecular de los VPH Oncogénicos mediante PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan. Rev Cient Cienc Med 2020;23(2): 122 - 128

del ADN se realiza mediante el uso de reporteros fluorescentes que permiten que la detección de los productos amplificados suceda en cada ciclo de la reacción. Estos estudios de genotipificación son de mucha importancia en la investigación del comportamiento clínico, ya que determinara la evolución de las lesiones, permite el desarrollo de nuevas vacunas y sirve como herramienta en la epidemiología de las infecciones⁴.

En Bolivia el Cáncer Cervicouterino es una de las principales causas de muerte en mujeres, siendo la enfermedad más frecuente en el grupo de 25 a 64 años de edad⁵, yunque en nuestro medio la citología sigue siendo la prueba más utilizada para este fin, esta tiene una sensibilidad baja (aproximadamente 75-84%)⁶ por lo que existe la gran necesidad para acceder a nuevas técnicas que permitan un diagnóstico más seguro y oportuno. Actualmente, la Sociedad Americana Contra El Cáncer, recomienda la realización de las "Pruebas conjuntas" o "Copruebas" en mujeres que estén en riesgo de desarrollar lesiones precancerosas, por lo tanto, el desarrollo de técnicas moleculares para la identificación del VPH, no significa la anulación de la prueba del Papanicolaou sino que son un complemento entre ambas⁷.

Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio tiene como objetivo determinar la infección por VPH y los genotipos circulantes en muestras genitales de varones y mujeres que se procesaron en el "Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular LABOGEN" (La Paz – Bolivia) mediante la aplicación de tecnología molecular de tipo PCR en Tiempo Real con Sondas TaqMan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio transversal y descriptivo, donde se trabajó con 151 muestras de hisopados genitales correspondientes a 134 mujeres y 17 varones que asistieron al "Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular LABOGEN" de la ciudad de La Paz, Bolivia durante el periodo de mayo del 2013 a julio del 2014, los cuales solicitaban el análisis para la detección de VPH por PCR en Tiempo Real.

La colección de dichas muestras y su posterior análisis fue realizado bajo la Autorización del Comité de Bioética de la Universitat de Bar-

celona; en la cual se consideró la inclusión de todos los pacientes que solicitaron el análisis de laboratorio por PCR en Tiempo Real para VPH bajo una previa valoración médica, sin considerar su edad, sexo y lugar de residencia, los cuales fueron derivados al laboratorio por presentar algunas de las siguientes características: procesos infecciosos en región genital, diagnóstico clínico de cervicitis, diagnóstico citológico positivo y diagnóstico histopatológico confirmado para algún proceso de malignidad. Quedando excluidas del estudio, aquellas personas que no requerían las pruebas para detección de VPH y aquellas que no brindaron su consentimiento para la inclusión en el estudio.

El tipo de muestreo fue de conveniencia, ya que el número de muestras con el que se trabajó fue el total de hisopados uretrales y vaginales que se alcanzó a recolectar durante el periodo de estudio, lo cual estuvo determinado por el número de pacientes que asistieron a nuestro servicio de laboratorio. Con relación a la variable edad, los pacientes se encontraban entre las edades de 15 a 72 años, y estos fueron clasificados en dos grupos: de 15 – 29 años y de 30 – 72 años, esto se realizó tomando en cuenta las recomendaciones de la American Cancer Society, la cual establece que en mujeres a partir de los 30 años para arriba se recomienda la prueba Papanicolaou junto con la prueba para la identificación genética del VPH para la detección y control del Cáncer de Cuello Uterino⁷.

Extracción de ADN

El material genético fue aislado a partir de las muestras de hisopados genitales mediante el Kit de Extracción de ADN: "PureLink® Viral RNA/DNA Kits" (Invitrogen – ThermoFisher Scientific®), siguiendo las instrucciones del mismo.

Identificación de VPH Alto Riesgo por PCR en Tiempo Real

Para determinar la presencia de ADN de VPH de Alto Riesgo en las muestras extraídas, se realizó una PCR en Tiempo Real como técnica de screening, para dicho efecto se utilizó el equipo Step One Plus™ (ThermoFisher Scientific®) y el Kit Diagnóstico de la línea Daan Gene®: "High Risk Human Papillomavirus Fluorescent

Polymerase Chain Reaction Diagnostic Kit", siguiendo las indicaciones de este producto.

Ensayo de PCR en Tiempo Real para la Genotipificación de VPH16 y VPH18

Las secuencias genómicas que se utilizaron para la reacción de PCR en Tiempo Real fueron E6 para VPH16 y E7 para VPH18. Dichas regio-

nes fueron obtenidas del Gene Bank (National Center for Biotechnology Information, U.S.), a partir de los cuales se realizó el diseño de los primers y sondas Taqman para VPH16 y VPH18 mediante el software Primer Express de Applied Biosystems® (**Tabla 1**).

Una vez diseñados los primers y sondas TaqMan, estos fueron sintetizados mediante el Servicio de Oligo Síntesis de Applied Biosystems®. Las condiciones de reacción de la PCR en Tiempo Real para la genotipificación de VPH16 y VPH18, se establecieron siguiendo las instrucciones de diseño del producto "TaqMan® Universal Master Mix II" y el equipo Step One Plus™ (ThermoFisher Scientific®); generando de esta forma un ensayo de tipo dúplex, ya que el mismo permitirá la detección de dos genotipos oncogénicos a la vez, VPH16 y VPH18.

El análisis estadístico descriptivo para la distribución de frecuencias medidas de tendencia central y de dispersión de datos se realizó mediante el paquete estadístico: PASW Statistics 18®; y para el diseño de tablas y gráficas se utilizó el software Microsoft Excel® 2010.

RESULTADOS

De las 151 muestras analizadas para la identificación de VPH de Alto Riesgo se obtuvieron 41 casos positivos, todos correspondientes a mujeres, representando esto una prevalencia a nivel de la población femenina del 30,6%. Dentro de estas muestras positivas, 15 corresponden al grupo etario de 15-29 años y 26 al grupo de 30-72 años (**Tabla 2**). Las cargas virales detectadas fueron de una gran diversidad, desde 804 hasta

Tabla 1. Primers y Sondas diseñados para VPH16 y VPH18

VPH16	
Primer Forward	E6-Fw AGAATGTGTGTACTGCAAGCAACA
Primer Reverse	E6-Rv ATAAATCCGAAAAGCAAAGTCAT
Sonda	6FAM-TTACTGCGACGTGAGGTA-MGB/NFQ
VPH18	
Primer Forward	E7-Fw CCGACGAGCCGAACCA
Primer Reverse	E7-Rv TGGCTTCACACTTACAACACATACA
Sonda	VIC-AACGTCACACAATGTT-MGB/NFQ

Tabla 2. Casos Positivos de VPH de Alto Riesgo

		PCR VPH de Alto Riesgo		Total
		Detectado	No detectado	
Sexo	Femenino	41	93	134
		30,60%	69,40%	100%
	Masculino	0	17	17
		0,00%	100,00%	100%
	Total	41	110	151
		27,20%	72,80%	100%
Edad	15-29 años	15	33	48
		31,30%	68,80%	100%
	30-72 años	26	77	103
		25,20%	74,80%	100%
	Total	41	110	151
		27,20%	72,80%	100%

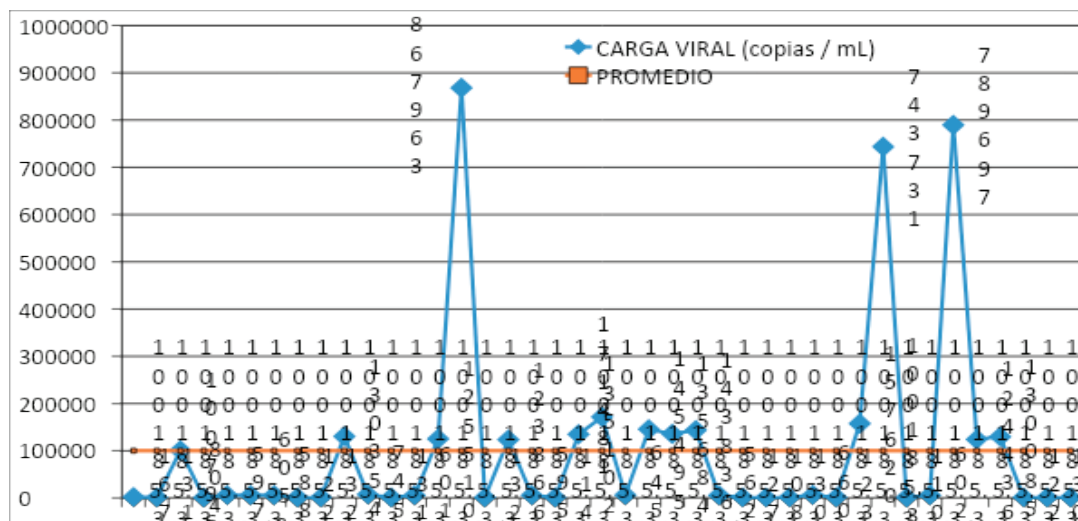


Figura 1. Valores Detectados de Carga Viral de VPH de Alto Riesgo. Análisis realizado mediante el kit comercial: "High Risk Human Papillomavirus Fluorescent Polymerase Chain Reaction Diagnostic Kit"

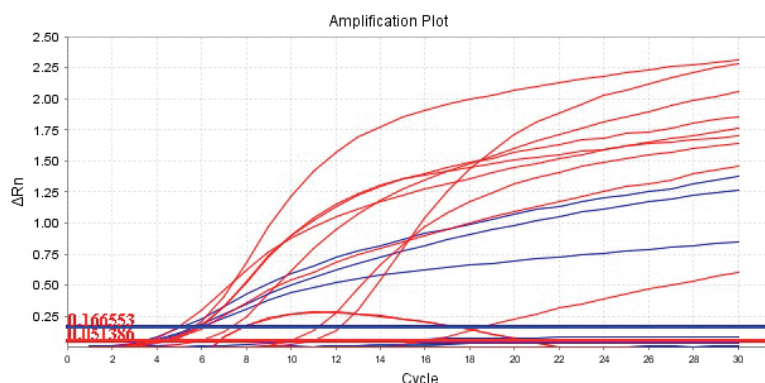


Figura 2. Curvas de Amplificación para VPH16 (rojo) y VPH18 (azul). Estudio realizado mediante la técnica de Genotipificación por PCR en Tiempo Real

867.963 copias/mL, obteniéndose una media de 100.185 copias/mL (Figura 1).

A partir de las 41 muestras positivas para VPH de Alto Riesgo, se obtuvieron 10 casos positivos para VPH16, ocho para VPH18 y en cinco casos se observó la coinfección por ambos VPH oncogénicos (Figura 2). Las frecuencias de estos casos positivos no presentan grandes diferencias a nivel de los grupos etarios (Tabla 3), y los casos reportados como No detectados corresponden a genotipos diferentes al VPH16 y VPH18.

DISCUSIÓN

Las 151 muestras de hisopados genitales fueron analizadas en primera instancia mediante el Kit comercial "High Risk Human Papillomavirus Fluorescent polymerase Chain Reaction Diagnostic Kit", técnica de PCR en Tiempo Real que permite identificar una región en común del material genético de los genotipos oncogénicos

16, 18, 31, 33, 45, 52, 56 y 58, sin embargo, esta técnica no identifica específicamente cuál de los genotipos es el que se encuentra presente en las muestras, razón por la cual se la utilizó como una prueba de screening para poder determinar cuáles de las muestras eran positivas o negativas para VPH de Alto Riesgo.

La prevalencia de casos positivos para VPH de Alto Riesgo en muestras de población femenina (30,6%), representa un valor mayor a diferencia de la prevalencia global para Latinoamérica (12,7%)⁹; a nivel nacional los estudios y publicaciones oficiales son escasos, encontrándose valores de prevalencia que varían desde un 16,0%¹⁰ al 18,1%¹¹.

Para cumplir con la fase de genotipificación del VPH16 y VPH18, en el presente estudio se optó por la técnica de PCR en Tiempo Real, estudios similares para este fin utilizaron adicionalmente técnicas como la Captura Híbrida¹² y actualmente ya se vienen desarrollando técni-

Tabla 3. Casos Positivos de VPH16, VPH18 y Coinfección

		Edad		
15-29 años		30-72 años	Total	
Coinfección	Detectado	3	2	5
		20%	7,70%	12,20%
	No detectado	12	24	36
		80%	92,30%	87,80%
	Total	15	26	41
		100%	100%	100%
VPH16	Detectado	6	4	10
		40%	15,40%	24,40%
	No detectado	9	22	31
		60%	84,60%	75,60%
	Total	15	26	41
		100%	100%	100%
VPH18	Detectado	4	4	8
		26,70%	15,40%	19,50%
	No detectado	11	22	33
		73,30%	84,60%	80,50%
	Total	15	26	41
		100%	100%	100%

cas más novedosas con el fin de determinar la presencia de los genotipos de alto riesgo, los cuales implican el uso de reactivos y equipamientos más sofisticados que implican también un mayor coste económico^{13,14}.

Mediante la aplicación de la técnica de PCR en Tiempo Real en las muestras analizadas, se logró determinar que la mayor prevalencia de casos positivos para VPH16 y casos de coinfección está presente en el grupo etario de 15 a 29 años; dicha prevalencia de infección por VPH en grupos de adolescentes y adultas jóvenes es coincidente con la presencia de diversos factores, principalmente con el inicio de las relaciones sexuales, aspecto que tiende a disminuir en edades posteriores manteniéndose en niveles muy bajos¹⁵. En Bolivia, un estudio destacable demuestra mediante técnicas de PCR y genotipificación por hibridación, la presencia de los VPH 16, 31, 52 y 51 como los más prevalentes¹¹ a nivel Latinoamérica, los estudios más recientes basados también en la tecnología de la PCR se-

ñalan al VPH16 como el de mayor frecuencia, en Colombia por ejemplo, se determinó su presencia en un 37,44%¹⁶ y en Perú con un 23,8%¹⁷. Un estudio que si refleja la coinfección por VPH16 y 18 es el realizado en Brasil por Pinheiro et al, en el cual realizaron su análisis en muestras de biopsias cervicales con lesiones, demostrando la presencia de una coinfección en un 75,4%¹⁸.

Con relación a la presencia del VPH18 obtenido en el presente estudio (19,5%), este varía considerablemente en diferentes investigaciones, en Latinoamérica y según la región geográfica de la población en estudio; se pueden encontrar estudios donde su presencia es nula¹¹, hasta investigaciones donde los valores pueden variar desde un 3,1%¹⁹ al 54,2%²⁰. La diferencia entre los valores obtenidos en el presente estudio y los ya citados anteriormente, varían claramente según la población en estudio, sin embargo, todas estas investigaciones con la finalidad de demostrar la distribución epidemiológica de los diferentes tipos oncogénicos de VPH buscan principalmente coadyuvar al desarrollo e implementación de nuevas vacunas contra el VPH³.

CONCLUSIÓN

Mediante la optimización e implementación de nuevas técnicas moleculares, así como lo es nuestra técnica de genotipificación por PCR en Tiempo Real, se pretende mejorar el seguimiento epidemiológico sobre la presencia de los VPH de Alto Riesgo y así proporcionar una mejor guía sobre la diseminación y presencia de los distintos genotipos oncogénicos de VPH en nuestra población.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del programa de "Maestría en Medicina Tropical y Salud Internacional", desarrollado por la Universitat de Barcelona en convenio con la Universidad Mayor de San Andrés

REFERENCIAS

1. Georgescu S, Mitran C, Mitran M, Caruntu C, Sarbu M, Matei C, et al. **New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress.** J Immunol Res. [Internet]. 2018 [Citado el 16 de Enero de 2020]; 2018. Disponible en: <http://downloads.hindawi.com/journals/jir/2018/5315816.pdf>
2. Gravitt P. **The known unknowns of HPV natural history.** J Clin Invest. [Internet]. 2011 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 121(12): 4593-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225991/pdf/JCI57149.pdf>
3. Dadar M, Chakraborty S, Dhama K, Prasad M, Khandia R, Hassan S, et al. **Advances in Designing and Developing Vaccines, Drugs and Therapeutic Approaches to Counter Human Papilloma Virus.** Front Immunol. [Internet]. 2018 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 9:2478. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240620/pdf/fimmu-09-02478.pdf>
4. Gradissimo A, Burk R. **Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention.** Expert Rev Mol Diagn. [Internet]. 2017 [Citado el 16 de Enero de 2020]; 17(4):379-91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904788/pdf/nihms926180.pdf>
5. Ministerio de Salud y Deportes – Estado Plurinacional de Bolivia. **Plan Nacional de Prevención Control y Seguimiento de Cáncer de Cuello Uterino 2009 – 2015** [Internet]. 2009 [Citado el 28 de Octubre de 2019]. Disponible en: https://www.comunidad.org.bo/assets/archivos/normativas/plan_nacional_de_prevencion_control_y_seguimiento_de_cancer_de_cuello_uterino_2009-2015.pdf
6. Rojas G, Córdova C, Sánchez J. **Evaluación del estudio de Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical en la Unidad Especial Centro de Apoyo Diagnóstico San Rafael.** Rev Esp Med Quir. [Internet]. 2012 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 17(2):76-80. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2012/rmq122c.pdf>
7. American Cancer Society. **El VPH y las pruebas del VPH** [Internet]. 2019 [Citado el 28 de Octubre de 2019]. Disponible en: <http://www.cancer.org/es/cancer/causas-del-cancer/agentes-infecciosos/vph/vph-y-pruebas-para-vph.html>
8. Chan P, Picconi M, Cheung T, Giovannelli L, Park J. **Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing.** Crit Rev Clin Lab Sci. [Internet]. 2012 [Citado el 14 de Septiembre de 2019]; 49(4):117-36. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469219/pdf/bcls49-117.pdf>
9. Moya J, Rojas V. **Tendencias en la investigación del Virus de Papiloma Humano en Latinoamérica frente a los países de altos ingresos.** Rev Colomb Obstet Ginecol. [Internet]. 2017 [Citado el 14 de Septiembre de 2019]; 68(3):202-17. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v68n3/0034-7434-rcog-68-03-00202.pdf>
10. Rodríguez P, Sejas M, Barriga J, Yañez R, Villarroel C, Ustariz K, et al. **Prevalencia y caracterización genotípica del virus del papiloma humano en mujeres de áreas urbanas y rurales de Cochabamba. Workshop en Epidemiología Molecular y Evolución de Enfermedades Infecciosas en América Latina.** Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD). [Internet]. 2012 [Citado el 16 de Enero de 2020]. Disponible en: http://www.colloque.ird.fr/workshop_enfermedades_infecciosas/container/prog_archivos/LIBRO.pdf
11. Teran C. **Prevalencia y factores asociados a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) y las lesiones causadas por el mismo en mujeres de 20 a 59 años del Municipio de Sucre, Bolivia** [Doctorado]. Universidad de Alcalá; 2014.
12. Hwang Y, Lee M. **Comparison of the AdvanSure Human Papillomavirus Screening Real-Time PCR, the Abbott RealTime High Risk Human Papillomavirus Test, and the Hybrid Capture Human Papillomavirus DNA Test for the Detection of Human Papillomavirus.** Ann Lab Med. [Internet]. 2012 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 32(3):201-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3339300/pdf/alm-32-201.pdf>
13. Rincon D, Morales L, Rincon B. **Modernas metodologías diagnósticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino.** Rev Univ Ind Santander Salud. [Internet]. 2017 [Citado el 14 de Septiembre de 2019]; 49(3):478-88. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v49n3/0121-0807-suis-49-03-00478.pdf>
14. Fu G, Miles A, Alphey L. **Multiplex Detection and SNP Genotyping in a Single Fluorescence Channel.** PLoS One. [Internet]. 2012

[Citado el 14 de Septiembre de 2019]; 7(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3260291/pdf/pone.0030340.pdf>

15. Dominguez S, Trujillo T, Aguilar K, Hernandez M. **Infección por el virus del papilloma humano en adolescentes y adultas jóvenes.** Rev Cubana Obstet Ginecol. [Internet]. 2012 [Citado el 16 de Enero de 2020]; 44(1). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v44n1/gin17118.pdf>

16. Del Rio L, Soto S, Camargo M, Sánchez R, Mancilla C, Patarroyo ME, et al. **The Prevalence of High-Risk HPV Types and Factors Determining Infection in Female Colombian Adolescents.** PLoS One. [Internet]. 2016 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 11(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112891/pdf/pone.0166502.pdf>

17. Sullcahuaman Y, Castro M, Mejía R, Castañeda C, Castillo M, Dolores K, et al. **Características sociodemográficas de mujeres peruanas con virus papiloma humano detectado por PCR-RFLP.** Rev Peru Med Exp Salud Publica. [Internet]. 2015 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 32(3):509-14. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n3/a15v32n3.pdf>

18. Pinheiro S, Marques A, Bones R, Marília R, Dornelles C, Rossetti M. **A high prevalence of human papillomavirus 16 and 18 co-infections in cervical biopsies from southern Brazil.** Braz J Microbiol. [Internet]. 2018 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 49:220-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328718/pdf/main.pdf>

19. Marin H, Torres C, Deluca G, Mbayed V. **Human papillomavirus detection in Corrientes, Argentina: High prevalence of type 58 and its phylodynamics.** Rev Argent Microbiol. [Internet]. 2015 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 47(4):302-11. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115001194?via%3Dihub>

20. Dalgo P, Lojan C, Cordova A, Acurio K, Arevalo A, Bobokova J. **Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador.** Infect Dis Obstet Gynecol. [Internet]. 2017 [Citado el 28 de Octubre de 2019]; 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498899/pdf/IDOG2017-8572065.pdf>