



UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI



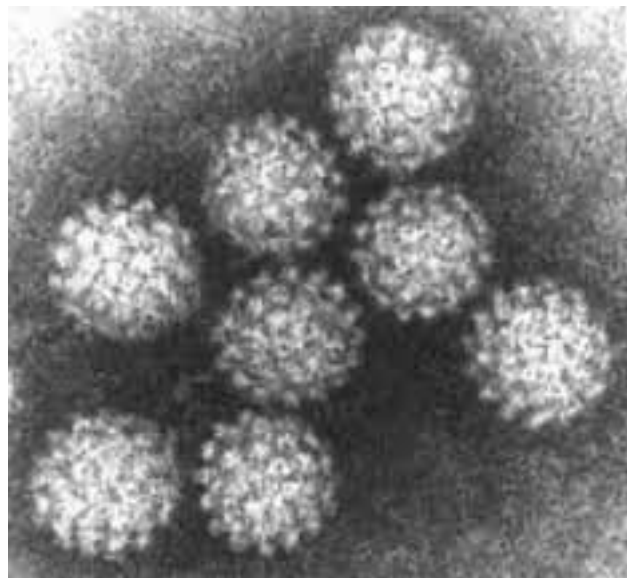
ELDINE  
PATOLOGÍA

Des de  
1981

**VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO  
DE CASOS ANALIZADOS EN ELDINE PATOLOGÍA Y  
CORRELACIÓN CON LOS DATOS BIBLIOGRÁFICOS**

Natalia Hernández Valenciano

TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Dr. Javier Capilla

En cooperación con: Eldine Patología

Supervisores: Dr. Lluís Pons y Gda. Helena Pérez

Junio 2023

Yo, Natalia Hernández Valenciano, con DNI 78589118-G, soy conocedora de la guía de prevención del plagio de la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, junio de 2023.

*Natalia Hernández Valenciano*

# Índice

1.	Datos del centro .....	1
2.	Resumen y palabras clave.....	2
2.1	Abreviaturas.....	3
3.	Introducción.....	5
3.1	Virus del papiloma humano (VPH) .....	5
3.1.1	Aspectos morfológicos y genéticos del VPH .....	5
3.1.2	Clasificación de los VPH .....	6
3.1.3	Curso natural de la infección por VPH.....	6
3.1.4	Lesiones cervicales secundarias premalignas producidas por VPH .....	9
3.1.5	Citología y toma de muestra (patología cérvico-vaginal).....	11
3.2	Técnicas de detección del VPH.....	12
3.2.1	Captura de Híbridos 2 ®.....	13
3.2.2	PCR Cobas ®.....	14
3.2.3	KIT AmpliPAP-HPV ®.....	15
3.2.4	QIAScreen PCR test ® .....	15
3.3	Epidemiología .....	23
4.	Hipótesis y objetivos.....	27
4.1	Hipótesis .....	27
4.2	Objetivos .....	27
5.	Material y métodos .....	28
5.1	Criterios de inclusión de los casos de estudio .....	28
5.2	Análisis estadístico .....	29
6.	Resultados y discusión.....	31
6.2	Resultado del análisis estadístico .....	31
6.2	Resultado del análisis comparativo .....	33
7.	Conclusiones .....	35
8.	Autoevaluación .....	36
9.	Bibliografía.....	37
10.	Agradecimientos.....	40
11.	Anexos.....	41
11.1	Protocolo de extracción de ADN en EZ1 .....	41
11.2	Protocolo de QIAScreen PCR Test ® .....	42
11.3	Ejemplo resultados QIAScreen PCR test ®.....	43
11.4	Tablas estadísticas .....	45

# Índice de figuras

Figura 1. Esquema general del genoma del VPH-16. Se representan los genes E1-E7, L1-L2 y la región LCR (Cortés C, .....)	5
Figura 2. Vía de entrada del VPH en la célula (Araldi et al., 2018). ....	7
Figura 3. Mecanismo molecular del VPH de evasión del sistema inmunitario del huésped (Wai et al., 2020). ....	7
Figura 4. Esquema de progresión del VPH a cáncer cervical. (Manual de la clínica de detección temprana patología cervical. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social Programa Nacional de Salud Reproductiva, n.d.).....	8
Figura 5. Esquema de lesiones cervicales premalignas (Altmeyers enciclopedia, 2021).....	10
Figura 6. Células escamosas cervicales con lesiones de bajo grado (Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) - MyPathologyReport.Ca, n.d.).....	10
Figura 7. Células escamosas con lesiones de alto riesgo CIN-II y CIN-III respectivamente (Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) - MyPathologyReport.Ca, n.d.)(Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (CIN Siglas En Inglés)   Eurocytology, n.d.).....	11
Figura 8. Colposcopia y esquema de las lesiones intraepiteliales que se pueden observar (SEGO   Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, n.d.) .....	12
Figura 9. Esquema hibridación por captura (de la Fuente-Villarreal et al., 2010). ....	14
Figura 10. Proceso general de la RT-PCR (Gene Expression Taqman Assay, 2022). ....	16
Figura 11. Principios del procedimiento de purificación del DNA (QIAGEN). ....	17
Figura 12. Mesa de trabajo de EZ1. (1) Tubos de elución de 1,5 ml; (2) Soportes y puntas de pipeta desechables; (3) Tubo de 1,5 ml con ARN transportador (CARRIER) y tampón de elución (AVE); (4) Tubos de 2 ml con la muestra; (5) Cartuchos de reactivos; (6) Bloque .....	18
Figura 13. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal naranja ( $\beta$ -globina) con el límite (“threshold”) a partir del cual se considera una muestra positiva. ....	19
Figura 14. Ejemplo de curva de amplificación del canal naranja ( $\beta$ -globina). ....	19
Figura 15. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal verde (VPH 16) con “threshold” a partir del cual se considera una muestra positiva. ....	20
Figura 16. Ejemplo curva de amplificación del canal verde (VPH 16). ....	20
Figura 17. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal rojo (VPH 18) ocn “threshold” a partir del cual se considera una muestra positiva.....	20
Figura 18. Ejemplo de curva de amplificación del canal rojo (VPH 18). ....	20
Figura 19. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal amarillo (otros VPH de alto riesgo) con “threshold” a partir del cual se considera una muestra positiva. ....	20
Figura 20. Ejemplo curva de amplificación del canal amarillo (otros VPH de alto riesgo). ....	20
Figura 21. Mapa de prevalencia mundial de cánceres cervicales atribuibles a VPH, ratios de incidencia estandarizados por edad (ASIR) (Scott-Wittenborn & Fakhry , 2021). ....	24

# Índice de tablas

Tabla 1. Colorantes fluorescentes y analitos que se detectan en QIAScreen VPH PCR test. ....	18
Tabla 2. Ejemplo de CTs de los diferentes canales para las muestras representadas de la Figura 14 a la 21.....	21
Tabla 3. Límite de detección (LoD) de QIAScreen PCR Test.....	22
Tabla 4. Mujeres con VPH en relación con la población atendida en las regiones sanitarias de Cataluña entre 2008-2011 (HPV INFORMATION CENTRE, n.d.). ....	25
Tabla 5. Mujeres con citologías positivas ASCUS en relación con la población atendida, porcentajes de seguimiento posterior y número de mujeres con VPH en las regiones sanitarias de Cataluña entre 2008-2011 (HPV INFORMATION CENTRE, n.d.). ....	26
Tabla 6. Regiones sanitarias de Cataluña de las que se han obtenido resultados positivos de VPH. ....	28
Tabla 7. Resultados (valor – p) de la prueba t y z para la comparación de una media numérica (edad) y otra no numérica (genotipo de VPH). ....	31
Tabla 8. Resultado (valor – p) del test ANOVA para la correlación entre la edad y los valores de RLU de la técnica de Captura de Híbridos 2 ®. ....	31
Tabla 9. Resultados (valor – p) del test de independencia para la correlación entre los datos de procedencia de la muestra y el genotipo detectado (QIAScreen PCR test ®, KIT AmpliPAP-HPV ® y PCR Cobas ®), y resultados del test de independencia entre los datos de procedencia de la muestra y valores de RLU de la técnica de hibridación por captura. ....	32
Tabla 10. Tabla comparativa de la incidencia global, la incidencia de Cataluña y la incidencia de los datos extraídos de Eldine Patología.....	33
Tabla 11. Tabla comparativa de la incidencia bibliográfica en las regiones sanitarias de Camp de Tarragona y Terres de l'Ebre y la incidencia de los datos extraídos de Eldine Patología. ....	34
Tabla 12. Preparación de la solución CARRIER-AVE en relación con el número de muestras. ....	41
Tabla 13. CTs de cada uno de los canales analizados en las figuras de la 14 a la 21.....	43
Tabla 14. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con QIAScreen.....	45
Tabla 15. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con QIAScreen.....	45
Tabla 16. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con QIAScreen. ....	46
Tabla 17. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 16 detectado con QIAScreen. ....	46
Tabla 18. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia y VPH 18 detectado con QIAScreen.....	47
Tabla 19. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia y otros genotipos de VPH detectados con QIAScreen. ....	48
Tabla 20. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con Ampligen.....	48

Tabla 21. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con Ampligen.....	49
Tabla 22. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con Ampligen. ....	49
Tabla 23. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 18 detectado con Ampligen. ....	50
Tabla 24. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y otros genotipos de VPH detectados con Ampligen. ....	51
Tabla 25. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con PCR Cobas. ....	52
Tabla 26. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con PCR Cobas.....	52
Tabla 27. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con PCR Cobas.....	53
Tabla 28. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 16 detectado con PCR Cobas. ....	53
Tabla 29. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 18 detectado con PCR Cobas. ....	54
Tabla 30. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y otros genotipos de VPH detectados con PCR Cobas. ....	54
Tabla 31. Prueba ANOVA. Correlación entre el valor de RLU observado en la prueba de hibridación por captura y la edad de la paciente. ....	55
Tabla 32. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y valores de RLU observados en la prueba de hibridación por captura. ....	55

# 1. Datos del centro

Eldine Patología es un laboratorio de anatomía patológica con sedes en Tarragona, Tortosa y Lleida, que nace en 1981 en Tortosa. En 2012 se traslada la central a Tarragona. El centro está dedicado principalmente a análisis histológicos, citológicos y celulares. Anualmente se realizan alrededor de 21330 análisis de biopsias, 27972 análisis de citologías y 21979 análisis moleculares, entre los que se incluyen las pruebas de detección de VPH.

Además de la actividad realizada en cada laboratorio, la empresa colabora con la Fundació Universitat Rovira i Virgili (FURV), los grupos de investigación de Bioactividad Molecular de los Alimentos (MoBioFood), Nutrigenómica y Quimioinformática y Nutrición del departamento de Bioquímica y Biotecnología de la URV, de Farmacobiología celular y NFOC-SALUT e Histología del departamento de Ciencias Básicas de la URV.

Fuera de la URV, también colabora con el Centro Tecnológico de Nutrición y Salud (CTNS), con el Barcelona Osseointegration Research Group (Grupo BORG), con la Universidad Europea de Madrid (UEM), con la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), con el CSIC de Barcelona y Vigo, con el Registre del Càncer de Tarragona (Fundació Lliga per a la Investigació i Prevenció del Càncer) y con el Institut Català d'Oncologia.

## **Eldine Tarragona**

Polígono Riuclar  
Calle del Plom 32 Puerta 19  
Tlf: 977139610

## **Eldine Lleida**

Calle Humbert Torres 6  
Tlf: 685576520

## **Eldine Tortosa**

Clínica Terres de l'Ebre, Plaza 1 d'Octubre  
Plaza 1 d'Octubre 32  
Tlf: 977588202

Página web: [www.eldinepatologia.com](http://www.eldinepatologia.com)

## 2. Resumen y palabras clave

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN que se caracteriza por su capacidad de infectar células epiteliales cutáneas y de la mucosa. Su infección puede ser de transmisión sexual (ITS), siendo bastante extendida entre la población sexualmente activa. La gran problemática que conlleva en las ITS es su posible persistencia en mucosas y progresión a lesiones intraepiteliales que pueden evolucionar a varios tipos de cáncer, entre los que cabe destacar el cáncer cervical, causado casi en su totalidad por una infección de determinados genotipos de VPH.

Gran parte de las ITS causadas por VPH son aclaradas por el sistema inmune. Aún así es necesario llevar a cabo un seguimiento de las pacientes para evitar la persistencia y progresión.

Existen diversas técnicas de detección de VPH. Algunas de ellas: Captura de Híbridos 2 ®, PCR Cobas ®, KIT AmpliPAP-HPV ® y QiaScreen PCR test ®; utilizadas en Eldine Patología.

A partir de las muestras analizadas en Eldine Patología en un periodo comprendido entre 01/01/2013 y 31/12/2022 procedentes de las diferentes áreas sanitarias de Cataluña, se pretende estudiar la correlación de los resultados con los datos bibliográficos de la epidemiología global y local.

Palabras clave: virus del papiloma humano, lesiones cervicales secundarias premalignas, neoplasia intraepitelial cervical, lesión intraepitelial escamosa, epidemiología.

## 2.1 Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFT: Ámbitos funcionales territoriales

ARN: Ácido ribonucleico

ASC: "Atypical Squamous cells"/ Células escamosas atípicas

ASC-H: "Atypical Squamous Cell, High grade lesion cannot be excluded"/  
Células escamosas atípicas, no puede descartarse HSIL

ASCUS: "Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance"/ Células  
escamosas atípicas de significado indeterminado

CIN: "Cervical Intraepithelial Neoplasia"/ Neoplasia intraepitelial cervical

HR-HPV: " High Risk Human Papillomavirus"/ Virus del papiloma humano de alto  
riesgo

HSIL: "High grade Squamous Intraepithelial Lesion"/ Lesión intraepitelial  
escamosa de alto grado

ICS: Institut Català de Salut

ITS: Infección de Transmisión Sexual

LBC: "Liquid base cytology"/ Citología de base líquida

LCR: "Long control region"/ Región de control larga

LR-HPV: "Low Risk Human Papillomavirus"/ Virus del papiloma humano de bajo  
riesgo

LSIL: "Low grade Squamous Intraepithelial Lesion"/ Lesión intraepitelial  
escamosa de bajo grado

RLU: "Relative Luminescence Units"/ Unidades lumínicas relativas

PCR: "Polymerase Chain Reaction"/ Reacción en cadena de la polimerasa

PML-NBs: "Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies"

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano

### 3. Introducción

#### 3.1 Virus del papiloma humano (VPH)

##### 3.1.1 Aspectos morfológicos y genéticos del VPH

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, una familia de virus icosaédricos sin envoltura, con doble cadena corta de ADN como material genético, de entre 7-8 kb. Se caracteriza por su capacidad para infectar las células epiteliales cutáneas y especialmente de la mucosa, tanto oral como genital (Graham, 2017).

El genoma del VPH se divide principalmente en tres regiones funcionales:

- Región “early”: codifica para proteínas que participan en la transcripción replicación e interacción con la célula. E1 y E2, necesarias para la replicación del DNA y E4, E5, E6 y E7 que modifican la célula huésped para facilitar la replicación y facilitar la evasión inmune.
- Región “late”: segunda región que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside.
- Región “long control” (LCR): aunque es una región no codificante, incluye el origen de replicación (ori) y los sitios de unión para los factores de transcripción virales y celulares.

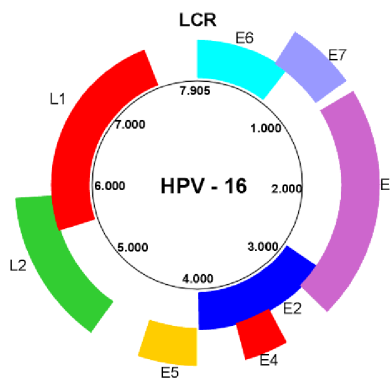


Figura 1. Esquema general del genoma del VPH-16. Se representan los genes E1-E7, L1-L2 y la región LCR (Cortés C, 2017)

### **3.1.2 Clasificación de los VPH**

El marco abierto de lectura del gen L1 es la secuencia del genoma más conservada, por lo que la clasificación filogenética se basa en las diferencias en este fragmento de la secuencia. Cada genotipo difiere de otro en, al menos, un 10% de la secuencia. Se conocen más de 200 tipos de VPH capaces de infectar humanos, 40 de ellos capaces de infectar regiones anogenitales. El VPH se puede clasificar en cinco subgrupos genotípicos diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ). Los subgrupos  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\nu$  tienen la capacidad de infectar las células epiteliales cutáneas. Solo los virus pertenecientes al subgrupo  $\alpha$  son capaces de infectar tanto el epitelio cutáneo como el de la mucosa.

Dentro de los subgrupos  $\alpha$  encontramos los denominados virus de alto riesgo (HR-HPV “high risk”) por su implicación en la mayoría de los cánceres cervicales, vaginales, vulvares, orofaríngeos y anales. Destacan los serotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 67, 68, 73 y 82. Los restantes constituyen los papilomavirus de bajo riesgo (LR-HPV, “low risk”) (Araldi et al., 2018).

Aproximadamente, el 80% de la población padecerá en algún momento de su vida algún tipo de infección anogenital transitoria por VPH que será resuelta, sin presentar síntomas, por el sistema inmunitario.

### **3.1.3 Curso natural de la infección por VPH**

El VPH infecta y se replica en los queratinocitos del epitelio mucoso y cutáneo. Necesita tener acceso a la capa inferior del epitelio, ya sea a través de microabrasiones o heridas que permitan la exposición de esta capa inferior. Una vez que la partícula viral entra en contacto con la célula, se une con el heparán sulfato (HS), polisacárido presente cerca de la superficie celular en células animales. Posteriormente, el VPH transfiere un receptor secundario a los queratinocitos. A partir de esta transferencia, se producen una serie de cambios conformacionales que promueven la entrada del virus. Por un proceso de endocitosis, y por la acción de la proteína L2, el VPH traspasa la membrana citoplasmática. Una vez llegado este punto, aprovecha la rotura de la membrana nuclear al comienzo de la mitosis para poder acceder a él. La proteína L2 se asocia con los cromosomas mitóticos en forma de vesículas y se mantiene así

hasta el final de la mitosis y la restauración de la membrana nuclear (Van Doorslaer et al., 2018).

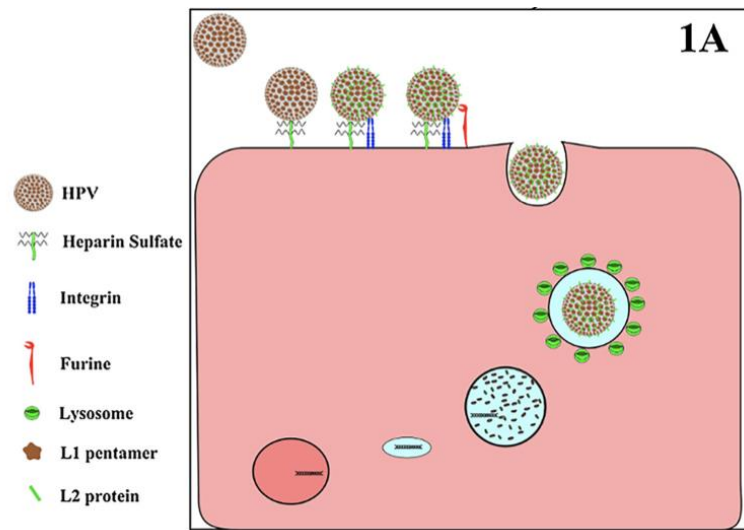


Figura 2. Vía de entrada del VPH en la célula (Araldi et al., 2018).

Dentro del núcleo existen unos orgánulos llamados cuerpos naturales de la leucemia promielocítica (PML-NBs “Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies”), los cuales son usados por el VPH para poder iniciar la transcripción y replicación de su genoma (Fera et al., 2021).

La replicación viral se produce en tres fases: amplificación inicial del material genético, mantenimiento de la replicación y amplificación vegetativa.

Los VPH de alto riesgo sintetizan, entre otras, las proteínas E5, E6 y E7 que inducen la evasión del sistema inmunitario y promueven la persistencia en las células huésped previniendo la diferenciación y la muerte celular (a través de la degradación de p53), inhibiendo la senescencia replicativa y promoviendo la proliferación celular (de Sanjosé et al., 2018).

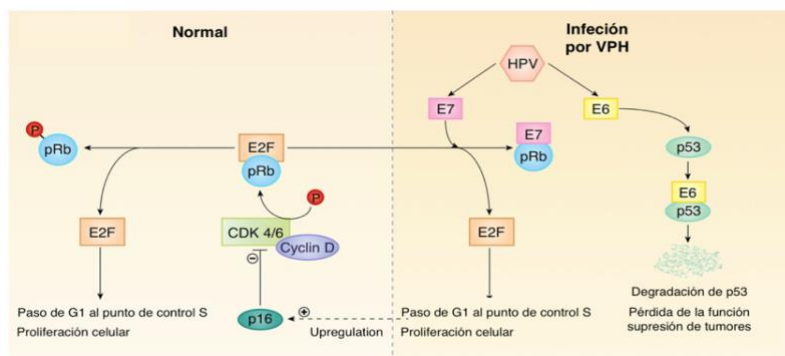


Figura 3. Mecanismo molecular del VPH de evasión del sistema inmunitario del huésped (Wai et al., 2020).

En los casos en los que el sistema inmune del paciente es deficiente o no consigue resolver la infección y persiste en el tiempo, se puede producir una progresión a una lesión premaligna intraepitelial glandular o escamosa, la cual puede acabar evolucionando a carcinoma (cáncer epitelial).

Una de las consecuencias de la infección persistente de un VPH de alto riesgo es la integración accidental del genoma viral en la cromatina de la célula huésped. Dependiendo del punto de integración esto puede promover un proceso de oncogénesis. Cabe destacar que este hecho es contraproducente para el virus ya que impide que complete su ciclo de vida y, por consecuencia, impide que pueda sintetizar viriones infectivos.

Alrededor del 99,7% de los casos de cáncer cervical están causados por una infección persistente de VPH de alto riesgo. La infección por VPH es una condición necesaria, pero no suficiente para causar cáncer de cérvix en la mayoría de los casos (Okunade, 2020).

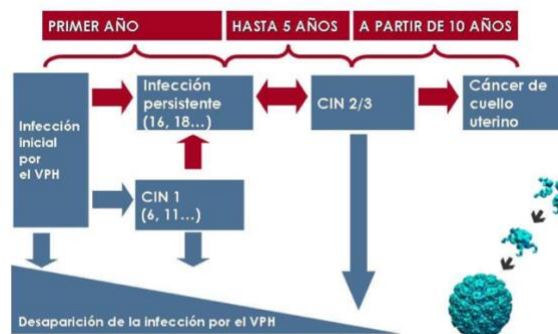


Figura 4. Esquema de progresión del VPH a cáncer cervical. (Manual de la clínica de detección temprana patología cervical. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social Programa Nacional de Salud Reproductiva, n.d.)

Hay factores determinantes conocidos que pueden influir en la oncoprogresión de la infección por VPH, como puede ser el tipo viral, la persistencia de la infección y la carga viral por unidad de células, además de factores ambientales entre los que encontramos:

- Coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) u otras situaciones que puedan comprometer el sistema inmunitario del paciente. Las interacciones entre ambos virus explican los cambios pato-fisiológicos cervicales y la persistencia del VPH (Dreyer, 2018). A parte, la coinfección por otras ITS también favorece la posible oncoprogresión por alteración del sistema inmune.

- El tabaquismo es un factor de riesgo significativo (Araldi et al., 2018).
- El uso de hormonas anticonceptivas orales contribuye a que el ADN del VPH se integre en el genoma huésped. El riesgo de cáncer cervical se ve incrementado a partir de los cinco años de uso ininterrumpido (Gadducci et al., 2020).
- Se ha visto una relación entre la alta paridad y la progresión a cáncer de cérvix debido a los cambios hormonales que se producen durante el embarazo (Pimple & Mishra, 2022).
- Una dieta rica en carotenoides, Vitamina C y Vitamina E puede servir de protección contra la progresión a cáncer de cérvix (Pimple & Mishra, 2022).
- La vacunación también es un factor determinante, disminuyendo los porcentajes de positividad en aquellas zonas en las que se han implantado programas de vacunación (Álvarez García et al., 2022).

### **3.1.4 Lesiones cervicales secundarias premalignas producidas por VPH**

Las infecciones cervicales persistentes por VPH pueden producir lesiones intraepiteliales secundarias premalignas las cuales pueden evolucionar a carcinoma. Existen varias nomenclaturas para describir este tipo de lesiones según su grado de afección del epitelio y su espesor.

El sistema Bethesda se creó para clasificar y describir las alteraciones citológicas de dichas lesiones. Dentro de este sistema encontramos una clasificación para los diferentes tipos de células epiteliales anormales.

Las células escamosas atípicas (ASC, "Atypical Squamous Cell") se pueden dividir entre células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS, "Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance") o células escamosas atípicas que no pueden excluir lesión intraepitelial escamosa de alto grado (ASC-H, "Atypical Squamous Cell of High grade")

El término neoplasia intraepitelial cervical (CIN, de sus siglas en inglés "Cervical Intraepithelial Neoplasia") fue propuesto en 1967 e incluye tres grados: CIN-I

para lesiones de bajo riesgo, CIN-II y CIN-III para lesiones de alto riesgo.

Debido a estudios que revelaron la incertidumbre producida en los casos en los que no quedaba claro en cuál de los tres grupos debía incluirse la muestra de estudio se planteó un sistema binario. En 1988 se aprobó el sistema de clasificación de lesión intraepitelial escamosa de bajo y de alto grado (LSIL, que agrupa CIN-I, y HSIL, que agrupa CIN-II y CIN-III, respectivamente).

La clasificación actual queda englobada y recogida según el sistema Bethesda 2014 (Khieu & Butler, 2023).

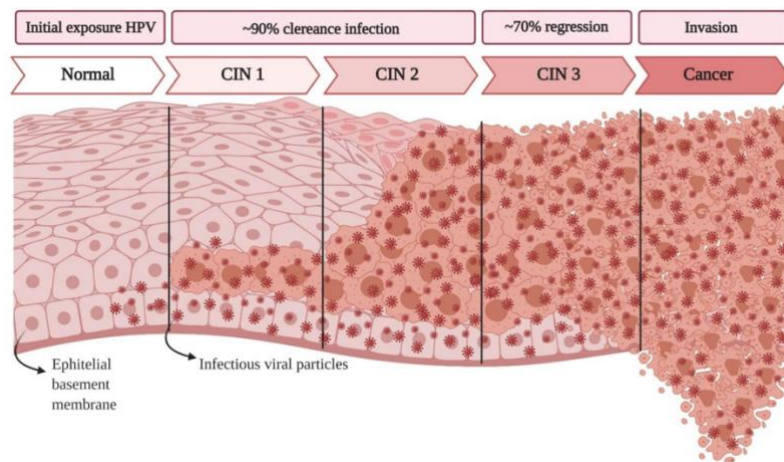


Figura 5. Esquema de lesiones cervicales premalignas (Altmeyers enciclopedia, 2021).

En las lesiones intraepiteliales de bajo grado (CIN-I), las células huésped que contienen el ADN del virus integrado en su propio genoma no superan el 30% de las células basales y normalmente no llegan a la capa parabasal ni superficial del epitelio. Son las lesiones más frecuentes y se caracterizan por tener células ligeramente displásicas con núcleos ampliados, oscuros e irregulares.

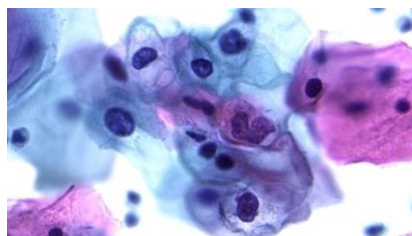


Figura 6. Células escamosas cervicales con lesiones de bajo grado (Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) - MyPathologyReport.Ca, n.d.).

Las lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN-II y CIN-III) se pueden dividir en dos grupos dependiendo de la gravedad de estas.

En las CIN-II las células atípicas superan el 50% del espesor del epitelio, mientras que en las CIN-III se encuentran entre el 90-100% del espesor del epitelio alcanzando sus capas parabasal y superficial. La relación núcleo/citoplasma es más alta que en las CIN-I, además presentan hiper cromatismo del núcleo, aumentando la intensidad de estas características de CIN-II a CIN-III.

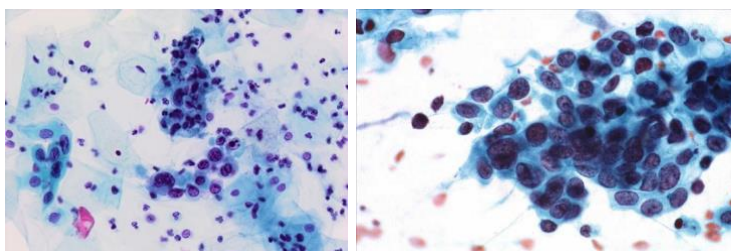


Figura 7. Células escamosas con lesiones de alto riesgo CIN-II y CIN-III respectivamente (Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) - MyPathologyReport.Ca, n.d.)(Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (CIN Siglas En Inglés) | Eurocytology, n.d.).

### 3.1.5 Citología y toma de muestra (patología cérvico-vaginal)

Las infecciones por VPH causan cambios morfológicos en las células de la exocérnix y el endocérnix. Las citologías se usan como método de cribado y se ha visto que previenen alrededor del 75% de las progresiones del VPH a cáncer cervical.

Todos estas alteraciones pueden ser diagnosticadas a partir del estudio de las citologías convencionales, que consisten en la toma de una muestra de células tanto de vagina como del cuello uterino y su análisis morfológicos y en algunos casos también molecular. El diagnóstico de dichas lesiones en las citologías se confirmará posteriormente en estudios histológicos (biopsias). Se estima que las citologías tienen un 40% menos de sensibilidad que las técnicas moleculares. Esta sensibilidad puede variar dependiendo de múltiples factores como la toma la muestra, la calidad de la extensión y la preservación. Cabe destacar que es un método con cierto grado de subjetividad y esto puede tener un efecto negativo en la interpretación de los resultados (Vahteristo et al., 2022).

Una vez se ha detectado el tipo de lesión que presenta la paciente es necesario realizar estudios complementarios (colposcopia y/o biopsia) y un seguimiento a largo plazo para prevenir una posible progresión oncológica (Kamal, 2022).

La colposcopia consiste en la utilización de un microscopio de baja intensidad

para examinar el cuello uterino. A partir de una observación detallada se pueden diferenciar las primeras fases de lesiones intraepiteliales escamosas, lo que servirá de guía para poder realizar una biopsia del tejido afectado.

Por otro lado, la biopsia consiste en la extracción de una pequeña cantidad de tejido del cuello uterino para analizarlo y detectar posibles lesiones. Existen diferentes tipos: biopsia con sacabocados, legrado endocervical, escisión electroquirúrgica con asa (LEEP) y biopsia de cono. Para su análisis y caracterización de las lesiones se siguen los criterios recogidos en el sistema Bethesda 2014 (Diagnóstico Del Cáncer de Cuello Uterino - NCI, n.d.).

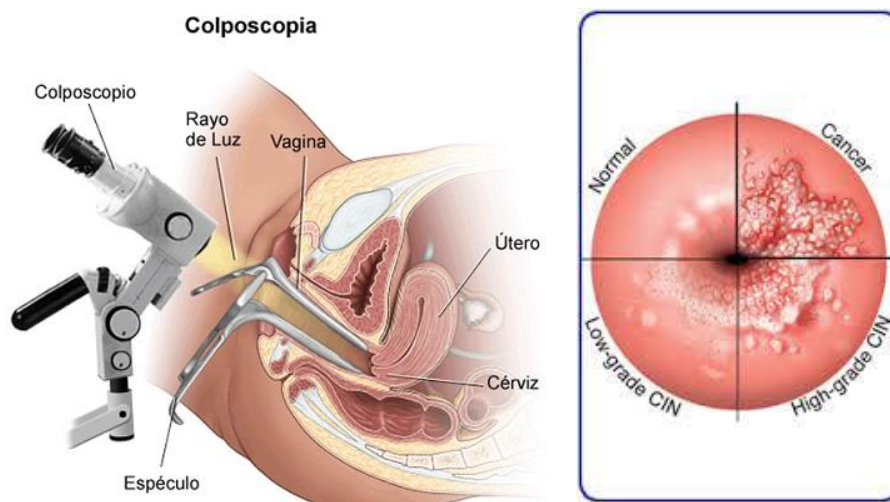


Figura 8. Colposcopia y esquema de las lesiones intraepiteliales que se pueden observar (SEGO | Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, n.d.)

### 3.2 Técnicas de detección del VPH

Para obtener un diagnóstico preciso sobre la presencia o no de VPH se utilizan técnicas moleculares que detectan el genoma del virus e incluso algunas pueden diferenciar entre VPH de bajo riesgo y VPH de alto riesgo.

Antes de realizar las técnicas moleculares de detección del VPH es necesaria una toma de muestra del paciente. Normalmente se extrae una muestra de células del cuello del uterino con un hisopo cervical (patología cervical), aunque dependiendo del paciente y del caso también se pueden tomar muestras de la zona anogenital, incluyendo la uretra, e incluso muestras orofaríngeas ya que son las zonas más susceptibles a una infección por VPH (Maver & Poljak, 2020).

Existen numerosas técnicas moleculares que permiten la detección del VPH. Estas técnicas varían en especificidad y sensibilidad y se utilizan unas u otras dependiendo del objetivo específico para el que se quiera tipificar el VPH. Las técnicas más importantes son: Captura de Híbridos 2 ®, PCR Cobas ®, KIT AmpliPAP-HPV ® y QIAscreen PCR test ® (QIAGEN – Parc Científic de Barcelona, n.d.).

Tanto la PCR Cobas ® como la Captura de Híbridos 2 ®, corresponden a técnicas de screening, es decir, son positivas cuando la carga viral es lo suficientemente alta para tener probabilidad de evolucionar a una lesión cancerígena.

Por otro lado, tanto el KIT AmpliPAP-HPV ® como QiaScreen PCR test ® son técnicas de tipificación, detectan la presencia de material genético independientemente de la cantidad que haya.

### **3.2.1 Captura de Híbridos 2 ®**

La técnica de hibridación por captura para la detección del VPH es capaz de detectar la presencia de hasta cinco tipos de VPH de bajo riesgo y 13 tipos de VPH de alto riesgo. El material genético se desnaturaliza hasta obtener una cadena simple de ADN vírico. Esta cadena simple hibrida con la cadena de ARN complementario al material genético del VPH de alto o bajo riesgo correspondiente. Estos híbridos ADN:ARN son capturados e inmovilizados en pocillos cubiertos por anticuerpos. A estos pocillos se les añade un conjugado de anticuerpos anti-híbrido con una fosfatasa alcalina y un sustrato quimioluminiscente que desencadena una emisión de luz proporcional al número de híbridos que se encuentran en cada pocillo. Es una técnica de evaluación semi-cuantitativa de alta sensibilidad y ha demostrado una efectividad del 94% en los sistemas de cribaje. Este método de detección permite distinguir entre VPH de alto o bajo riesgo, pero no distingue entre genotipos específicos (Sitarz & Szostek, 2019).

El resultado se obtiene en unidades lumínicas relativas (RLU), directamente proporcional a la carga viral presente en la muestra. En el 90% de los casos, niveles superiores a 100 RLU se asocian a una lesión cervical, mientras que si

se obtienen niveles inferiores a 10 RLU no se suele presentar ningún tipo de lesión (Varl et al., 2019).

Se han realizado estudios que muestran que la técnica de hibridación por captura tiene una sensibilidad clínica y especificidad para detectar casos con lesiones intraepiteliales de alto grado del 93,1% y 72,2% respectivamente (Park et al., 2012).

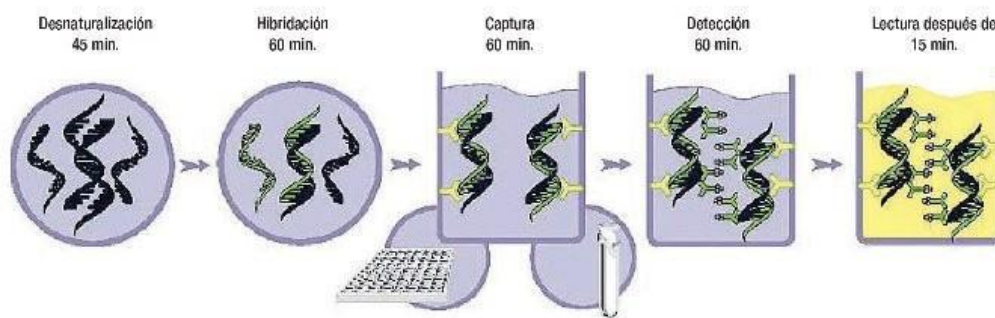


Figura 9. Esquema hibridación por captura (de la Fuente-Villarreal et al., 2010).

Su uso ha sido ampliamente difundido en diferentes y múltiples sistemas de cribaje sanitario público de cáncer cervical, con una amplia documentación bibliográfica al respecto.

### 3.2.2 PCR Cobas ®

La PCR Cobas amplifica unos 200 nucleótidos del gen que codifica para la proteína L1 de catorce tipos de VPH de alto riesgo. La muestra es una LBC (“liquid-based cytology”) en la que se ha sumergido un hisopo cervical. Se utilizan sondas unidas a fluoróforos. Si la sonda se une a una secuencia complementaria durante la qPCR se degrada, gracias a la actividad 5’-3’ exonucleasa de la polimerasa, lo que causa la degradación del fluoróforo y la fluorescencia podrá ser detectada. Las ventajas de esta técnica son: mayor sensibilidad que la hibridación por captura y menos reactividad cruzada con otros microorganismos. Cabe destacar que solo permite diferenciar entre VPH 16, VPH 18 y otros genotipos de VPH (Sitarz & Szostek, 2019).

La sensibilidad y la especificidad de la técnica se ha demostrado en diversos estudios en los que se obtienen niveles de sensibilidad del 89,7% y especificidad del 66,7% (Park et al., 2012), (Levi et al., 2016).

Su uso ha sido ampliamente difundido en diferentes y múltiples sistemas de cribaje sanitario público de cáncer cervical, con una amplia documentación bibliográfica al respecto.

### **3.2.3 KIT AmpliPAP-HPV ®**

La técnica KIT ampliPAP-HPV ® utilizada por Ampligen se basa en una extracción de ADN de una muestra clínica, se amplifican mediante PCR las regiones conservadas en todos los papilomavirus y además las regiones que corresponden a los genes E6 y E7 de los VPH oncogénicos. Si la PCR es positiva, se procede a la tipificación del virus mediante una batería de endonucleasas de restricción que reconocen secuencias específicas y una posterior electroforesis, de esta manera se puede determinar que cepa es la causante de la infección.

Su uso queda restringido a la disposición exclusiva del sistema sanitario privado, con lo cual no existe una bibliografía extensa al respecto.

### **3.2.4 QIAscreen PCR test ®**

QIAscreen PCR test ® de Qiagen está basada en la PCR de tiempo real y es capaz de detectar hasta quince genotipos de VPH de alto riesgo. Analiza el ADN aislado de muestras tanto cervicouterinas como vaginales. Se basa en la amplificación de un fragmento del gen E7 que se encuentra siempre en los genomas de virus presentes en los cánceres anogenitales. Durante cada ciclo de la PCR a tiempo real (RT-PCR “Real Time PCR”), la señal fluorescente aumenta de forma logarítmica al detectar el analito de interés, si supera un umbral preestablecido la muestra se considera positiva. Tiene la ventaja de que se pueden utilizar diferentes colorantes fluorescentes a la vez, por lo que se puede diferenciar si es un VPH 16, un VPH 18, los trece tipos restante de VPH de alto riesgo y el gen de la  $\beta$ -globina humana como control de la calidad del ADN de la muestra (Sitarz & Szostek, 2019).

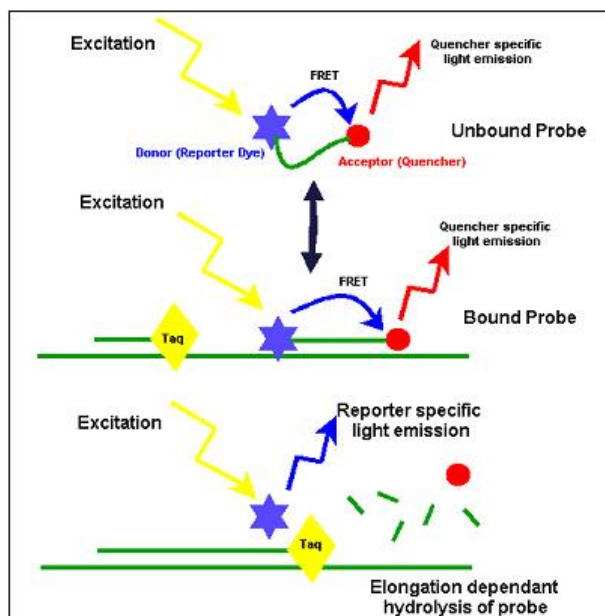


Figura 10. Proceso general de la RT-PCR (Gene Expression Taqman Assay, 2022).

Esta técnica ha sido utilizada en algunos sistemas de cribaje público y es la que se utiliza actualmente en Eldine Patología para la detección del VPH. Por esta razón, se detallan a continuación las características técnicas y funcionamiento de la misma.

Para poder llevar a cabo la PCR es necesario realizar una extracción y purificación del material genético con el fin de asegurar que la cantidad de ADN es la adecuada y es similar en cada muestra.

Las muestras son sometidas a un proceso de tratamiento previo a la purificación que consiste en la adición de 5 ml de suero fisiológico para conseguir que se desprenda el material genético del hisopo. Este paso se realiza en una campana de flujo diferente para evitar posibles contaminaciones.

Una vez todas las muestras se encuentran en el mismo formato y se les ha añadido el suero fisiológico se pasa a la preparación para la extracción y purificación del ADN del virus.

La purificación se lleva a cabo en cuatro pasos: lisis, unión, lavado y elución.

- El proceso de lisis se produce por la acción de proteinasa K y tampón de lisis, esta combinación llevará a la rotura de las proteínas de la envoltura vírica y a la inactivación de las nucleasas.
- La unión del ADN viral a las partículas magnéticas permite separarlo del resto de componentes presentes en la muestra que puedan interferir en la PCR.
- Una vez que los ácidos nucleicos del virus están ligados a las partículas magnéticas, el resto de los componentes se eliminan mediante tampones de lavado y etanol.
- El último paso consiste en la elución del ADN viral en el tampón de elución (AVE).

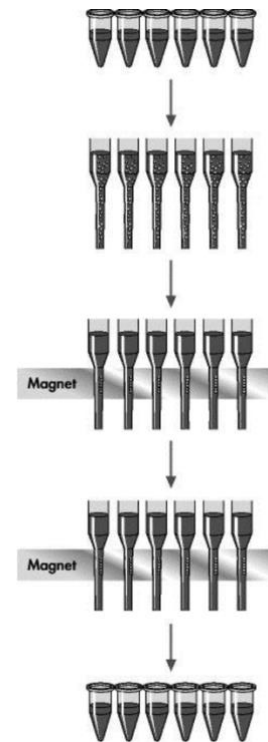


Figura 11. Principios del procedimiento de purificación del DNA (QIAGEN).

El ARN transportador (CARRIER) juega un papel fundamental en el proceso de purificación del ADN vírico. Contribuye a la unión de los ácidos nucleicos virales a las partículas magnéticas, esto es de gran ayuda sobre todo si la muestra contiene poca cantidad de ácidos nucleicos. Además, reduce la probabilidad de degradación del material genético viral en el caso de que las ribonucleasas no hayan sido desnaturalizadas correctamente por el tampón de lisis. No añadir el ARN transportador supone un riesgo a la hora de obtener las cantidades necesarias de ADN vírico.

Para introducir las muestras y reactivos en la mesa de trabajo del extractor de ácidos nucleicos (EZ1 de QIAGEN) es necesario seguir los pasos establecidos por la empresa de fabricación, además de respetar las posiciones preestablecidas para cada reactivo. Esto permitirá la correcta extracción y purificación del ADN vírico.

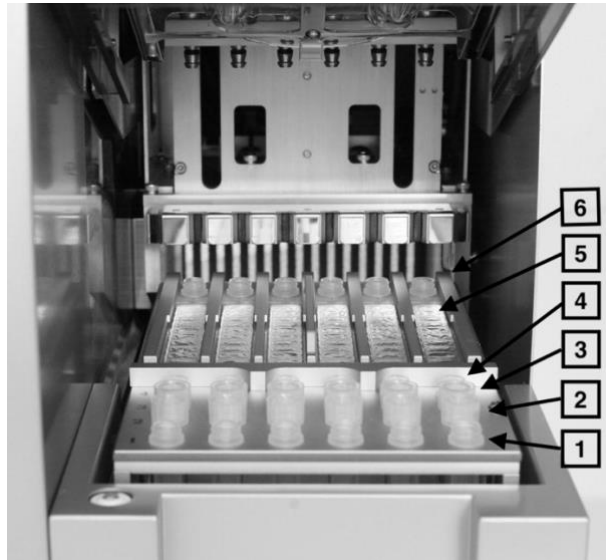


Figura 12. Mesa de trabajo de EZ1. (1) Tubos de elución de 1,5 ml; (2) Soportes y puntas de pipeta desechables; (3) Tubo de 1,5 ml con ARN transportador (CARRIER) y tampón de elución (AVE); (4) Tubos de 2 ml con la muestra; (5) Cartuchos de reactivos; (6) Bloque

Una vez eluido el material genético del virus, puede ser almacenado entre 2°C y 8°C por un periodo menor a 24h y entre -80°C y -20°C para periodos de tiempo más largos.

La QIAscreen VPH PCR test ® es una técnica de QIAGEN, empresa especializada en diagnóstico molecular e inmunoensayos a través de productos que permiten la detección de microorganismos, condiciones de base genética u otros analitos de forma relativamente rápida y prescindiendo de protocolos complejos (QIAGEN – Parc Científic de Barcelona, n.d.).

La QIAscreen VPH PCR test ® detecta cualitativamente el material genético de quince tipos diferentes de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 67 y 68) basándose en la RT-PCR, dirigida contra el gen E7 (región “early”). Para esto, realiza 40 ciclos de PCR alcanzando una temperatura de 95° C. Cuenta con cuatro colorantes fluorescentes que permiten detectar cuatro analitos diferentes.

Tabla 1. Colorantes fluorescentes y analitos que se detectan en QIAscreen VPH PCR test.

Analito	Colorante fluorescente
β-globina	Naranja
VPH 16	Verde

VPH 18	Rojo
Otros VPH de alto riesgo	Amarillo

La  $\beta$ -globina es una proteína presente en el genoma humano de manera constitutiva. Por tanto, permite confirmar la presencia de ADN humano en la muestra a analizar y la ausencia de sustancias que puedan inhibir el proceso de PCR. Esto, junto con la adición de un control positivo en la posición uno del termociclador, sirve como referencia a la hora de determinar si la fiabilidad de los resultados es la adecuada o, en caso contrario, es necesario repetir el proceso.

La señal fluorescente aumenta de forma logarítmica en cada ciclo de PCR, para cada canal fluorescente por separado, creando una curva de amplificación para cada uno de ellos. Se considera una muestra positiva cuando la curva supera el umbral preestablecido (Anexo 11.2).

El análisis de los canales fluorescentes tiene lugar siempre en el mismo orden:  $\beta$ -globina, VPH 16, VPH 18 y otros VPH de alto riesgo.

Para que una muestra se considere positiva no se tiene en cuenta el valor de CT de la  $\beta$ -globina (número de ciclos que tarda en superar el “threshold” o límite preestablecido), pero si es importante a la hora de evaluar la negatividad o validez del resultado. Si no supera la línea del “threshold” se considera un resultado no válido.

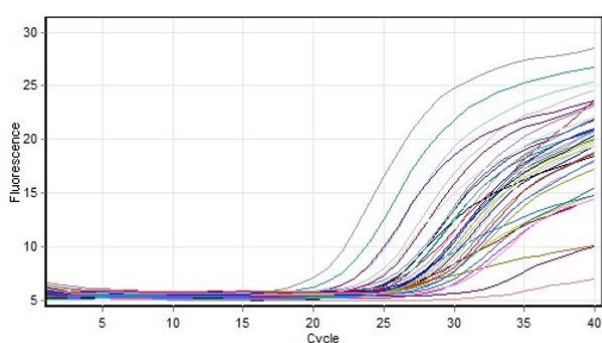


Figura 14. Ejemplo de curva de amplificación del canal naranja ( $\beta$ -globina).

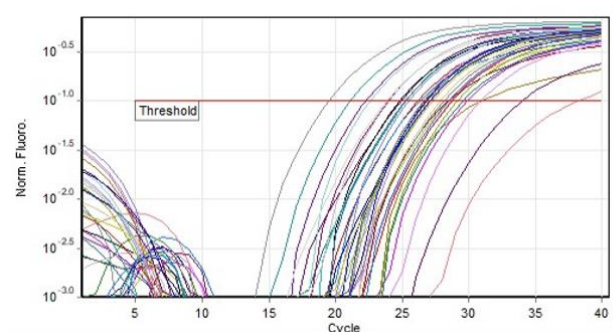


Figura 13. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal naranja ( $\beta$ -globina) con el límite (“threshold”) a partir del cual se considera una muestra positiva.

A la hora de interpretar el canal del VPH 16 (canal fluorescente verde) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la  $\beta$ -globina podemos determinar que muestras son positivas. En este caso, son importantes los valores de CT de las muestras que han superado el "threshold". El procedimiento es el mismo para el resto de canales fluorescentes: VPH 18 (canal rojo) y otros VPH de alto riesgo (canal amarillo).

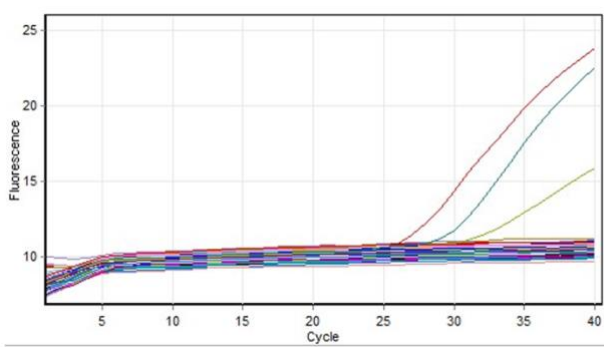


Figura 16. Ejemplo curva de amplificación del canal verde (VPH 16).

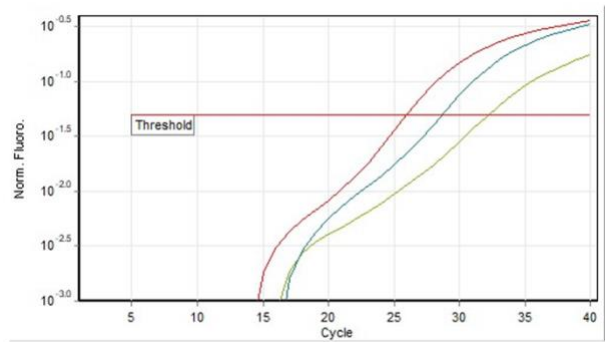


Figura 15. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal verde (VPH 16) con "threshold" a partir del cual se considera una muestra positiva.

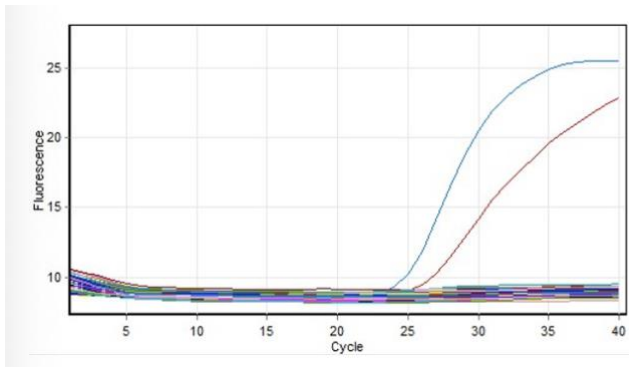


Figura 18. Ejemplo de curva de amplificación del canal rojo (VPH 18).

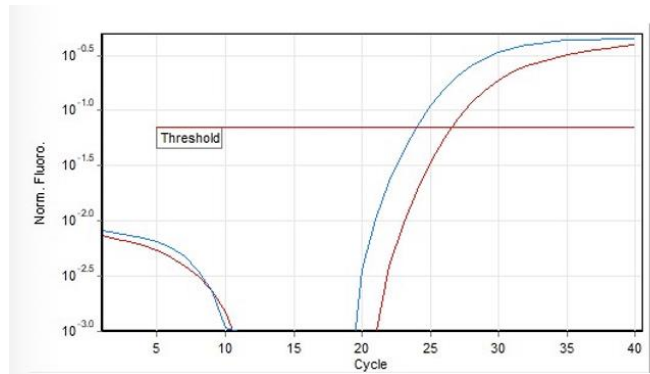


Figura 17. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal rojo (VPH 18) con "threshold" a partir del cual se considera una muestra positiva.

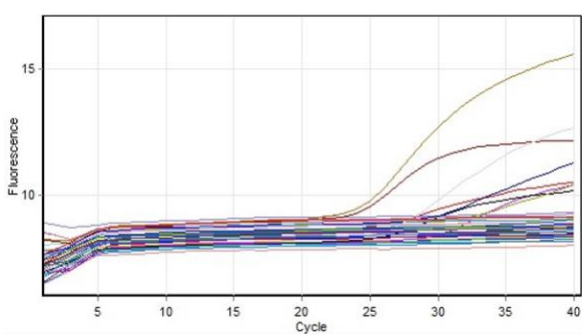


Figura 19. Ejemplo curva de amplificación del canal amarillo (otros VPH de alto riesgo).

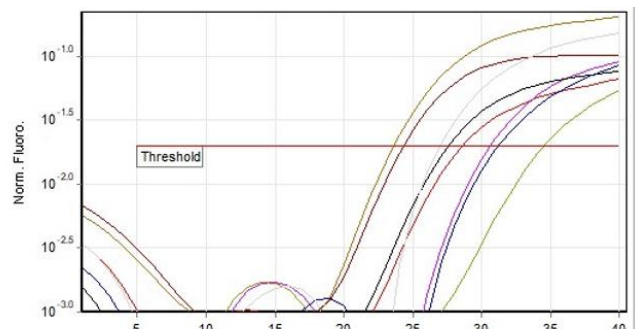


Figura 20. Ejemplo de curva de amplificación normalizada del canal amarillo (otros VPH de alto riesgo) con "threshold" a partir del cual se considera una muestra positiva.

Los datos representados (Figura 14 a 20) pertenecen al mismo grupo de muestras analizadas en una misma RT-PCR. Los valores CT obtenidos para el control positivo confirman la fiabilidad de los resultados (Anexo 11.2). La muestra 8332 sugiere un resultado negativo para todos los canales fluorescentes, excepto el de la  $\beta$ -globina que debe superar el “threshold”, independientemente de su valor, para poder considerar el resultado válido. Por otro lado, las muestras 8362 y 8333 sugieren un resultado positivo para otros VPH de alto riesgo y para VPH 18 respectivamente. Para la muestra 8374, el “threshold” es superado tanto en el canal fluorescente del VPH 16 como en el canal de otros VPH de alto riesgo, teniendo en cuenta los valores de las CT solo se considera positivo para VPH 16.

Tabla 2. Ejemplo de CTs de los diferentes canales para las muestras representadas de la Figura 14 a la 21.

<b>Nº de muestra</b>	<b>CT <math>\beta</math>-globina</b>	<b>CT VPH 16</b>	<b>CT VPH 18</b>	<b>CT otros VPH de alto riesgo</b>
Control +	26,16	25,94	26,50	28,63
8232	28,49	-	-	-
8362	24,78	-	-	27,59
8374	29,16	32,18	-	34,50
8333	26,30	-	23,91	-

Para realizar la RT-PCR se utiliza el equipo Rotor-Gene Q MDx y es necesario realizar previamente la extracción y purificación del ADN del virus como se ha descrito anteriormente. Ambos procesos están sujetos a una serie de limitaciones entre las que destacan la recogida, el transporte y el almacenamiento de las muestras. Además de la adopción de buenas prácticas de laboratorio y el correcto mantenimiento del equipo.

Por lo que respecta al rendimiento, el límite de detección es un parámetro fundamental, este se define como la cantidad de concentración mínima a la que un analito puede ser detectado.

Tabla 3. Límite de detección (LoD) de QIAscreen PCR Test.

<b>Analito</b>	<b>LoD (copias por PCR)</b>
VPH 16	206
VPH 18	69
VPH 39, 45	617
VPH 31, 33, 35, 51, 56, 59, 66, 67	1852
VPH 52, 58, 68	5556
β-globina	617

El equipo Rotor-Gene Q MDx presenta una elevada especificidad frente al ADN de los genomas de VPH de interés. Para el resto de VPH la especificidad analítica asciende a una concentración de al menos 46000 copias/prueba. Por otro lado, la especificidad frente a tres de los microorganismos vaginales con mayor potencial patogénico: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Candida albicans*, asciende a una concentración de al menos 10000 copias/prueba.

Además se validaron tanto la sensibilidad como la especificidad clínicas de la RT-PCR para neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado. Esto se hizo mediante el análisis de pruebas provenientes de mujeres con citologías positivas en CIN-II, lesión provocada normalmente por un VPH de alto riesgo, se demostró una sensibilidad y especificidad del 96,8% y 95,1% respectivamente.

De acuerdo con las directrices internacionales de la prueba de VPH para la evaluación de cáncer uterino, se evaluó la reproducibilidad entre laboratorios y dentro de un mismo laboratorio, siendo estas del 99,2% y del 99,5% respectivamente.

Por lo que respecta a las sustancias interferentes, se comprobó que los restos de EDTA (0,5 M), HCl (1 N), microesferas de sílice (1 µl), sangre (1 µl), urea (40 g/100 ml) y tampón de lisis interfieren en el rendimiento de la prueba. Por otro lado, ETOH al 96% (1 µl) y DMSO al 4% (V/V) no interfieren con el rendimiento.

Cabe destacar que las muestras, tanto de la extracción y purificación del ADN como de la QIAscreen PCR test, tienen que tratarse como material potencialmente infeccioso.

### **3.3 Epidemiología**

Se calcula que el 80% de la población sexualmente activa padecerá en algún momento una infección por VPH. Aproximadamente, entre el 10-20% de las mujeres infectadas sufrirán una infección persistente que llevará a una progresión a cáncer cervical. Además, el VPH puede progresar a otros tipos de cáncer como cánceres anogenitales y orofaríngeos tanto en población masculina como femenina.

Es una infección de transmisión sexual, por lo que tanto hombres como mujeres pueden ser portadores asintomáticos o víctimas de la infección. Se estima que la prevalencia global de mujeres infectadas por VPH, tanto sintomáticas como asintomáticas es del 11,7% de la población, frente a una prevalencia de hombres infectados del 21%. Además, se ha visto mayor incidencia en mujeres jóvenes (20-30 años), mientras que en hombres no se ha visto una correlación clara entre la incidencia y la edad de estos. A pesar de que haya un mayor porcentaje de hombres infectados, la infección persistente del VPH se asocia generalmente con la progresión a cáncer cervical (está presente en el 99,7% de los casos). No obstante, también puede progresar a algún tipo de cáncer anogenital en hombres.

La prevalencia global de infecciones de VPH cervical en mujeres con citologías normales es del 11,7%, aunque este dato aumenta significativamente en mujeres con citologías atípicas. Una citología atípica es necesaria pero no obligatoria para tener un diagnóstico positivo en VPH.

En Europa la prevalencia de infecciones cervicales causadas por VPH varía entre países. Aun así, se ha establecido que en Europa del este la prevalencia es bastante más alta que en las zonas suroeste y norte del continente (29,1%, 9% y 10% respectivamente). Con un aumento de las infecciones en mujeres de entre 20 y 30 años.

En América del Norte, al igual que en Europa, la mayor tasa de prevalencia se encuentra en mujeres jóvenes y oscila entre el 4% y el 20% de las mujeres con citología normal. A partir de 2007 y con el inicio de la vacunación se ha visto una reducción del 86% en mujeres de entre 14-19 años y del 71% en mujeres de entre 20-24 años.

En África encontramos las prevalencias más altas de infecciones cervicales causadas por VPH que oscilan entre el 17% y el 34% dependiendo de la región del país. Siendo la zona este la más afectada. La prevalencia se ve aumentada en presencia de otras infecciones como el VIH que comprometen el sistema inmunitario.

La prevalencia en Asia y Oceanía alcanza el 9,4% de las mujeres con citologías normales. Se ve mayor afectación en Oceanía, Mongolia y Corea.

Sudamérica, junto con África, es la región con mayor prevalencia de infecciones cervicales causadas por VPH llegando a alcanzar el 20,4% (Scott-Wittenborn & Fakhry, 2021).

Cabe destacar que a partir de la implementación de los programas de vacunación los porcentajes de prevalencia han ido disminuyendo a lo largo de los años (Álvarez García et al., 2022).

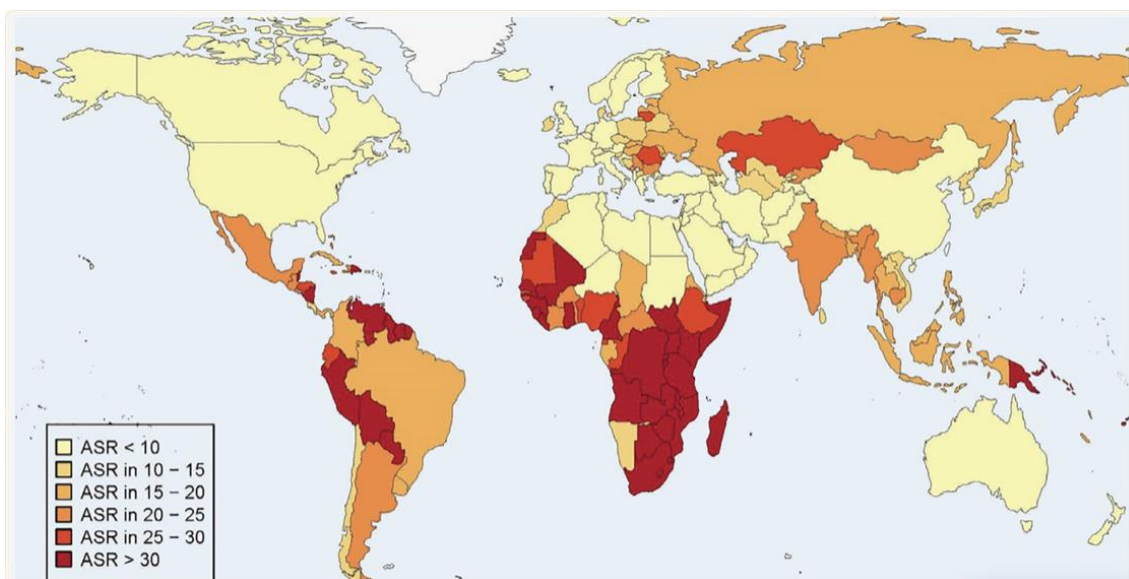


Figura 21. Mapa de prevalencia mundial de cánceres cervicales atribuibles a VPH, ratios de incidencia estandarizados por edad (ASIR) (Scott-Wittenborn & Fakhry, 2021).

Actualmente, en España la prevalencia de infección por VPH tanto en hombres como en mujeres es del 14%, siendo las comunidades más afectadas La Rioja, Murcia, Baleares y Navarra (>15%) y las menos afectadas Cantabria, Asturias, Castilla y León y Castilla la Mancha (<10%). Siguiendo la tendencia global, la prevalencia aumenta en mujeres jóvenes, de entre 20-30 años, llegando a alcanzar el 25% y en hombres oscila entre el 30-50%. Se estima que en España se diagnostican alrededor de 2000 casos de cáncer de cérvix al año asociados

al VPH (Álvarez García et al., 2022).

En Cataluña en 2018 se registró una prevalencia de 82,6 casos de infección por VPH por cada 100.000 habitantes. Siendo más del 50% personas entre los 25-39 años (SIVES 2020, n.d.). Los datos varían en función de la región sanitaria y son resultados obtenidos por el Institut Català de Salut (ICS) (Tabla 1), del que forman parte la mayoría de los centros sanitarios públicos con servicio ginecológico de Cataluña.

Tabla 4. Mujeres con VPH en relación con la población atendida en las regiones sanitarias de Cataluña entre 2008-2011 (HPV INFORMATION CENTRE, n.d.).

<b>Región sanitaria</b>	<b>Mujeres con VPH</b>	<b>Población atendida</b>	<b>Porcentaje de positivos</b>
Alt Pirineu	541	10697	5,1%
Barcelona ciutat	8372	246406	3,5%
Barcelona nord	14074	324433	4,3%
Barcelona sud	13035	312267	4,2%
Camp de Tarragona	2200	81019	2,7%
Catalunya central	4135	104384	4,0%
Girona	1750	38000	4,6%
Lleida	3120	81012	3,9%
Terres de l'Ebre	698	44052	1,6%

En relación a la presencia de lesiones secundarias, durante el periodo comprendido entre 2008-2011 en Cataluña, 11326 mujeres tuvieron un resultado citológico positivo en ASCUS. Estos datos revelan una relación con la edad de la mujer, a medida que aumenta la edad disminuye la probabilidad de tener una citología positiva en ASCUS. Ante una citología con este resultado se recomienda una prueba de detección de VPH en un periodo inferior a tres meses.

Si el resultado es positivo se hace una colposcopia y en caso de que también sea positiva una biopsia. Al 66,5% de las mujeres con citologías positivas se les

realizó un seguimiento y una prueba de detección de VPH. En cambio, al 33,5% restante no se les realizó ninguna prueba de detección o estas no fueron registradas (*HPV INFORMATION CENTRE*, n.d.).

Tabla 5. Mujeres con citologías positivas ASCUS en relación con la población atendida, porcentajes de seguimiento posterior y número de mujeres con VPH en las regiones sanitarias de Cataluña entre 2008-2011 (*HPV INFORMATION CENTRE*, n.d.).

<b>Región sanitaria</b>	<b>Citologías positivas en ASCUS</b>	<b>Población atendida</b>	<b>Porcentaje de ASCUS</b>	<b>Porcentaje de seguimiento</b>	<b>Porcentaje VPH de positivos</b>
Alt Pirineu	37	17236	0,2%	28,9%	72,7%
Barcelona ciutat	2549	388063	0,7%	65,4%	44,5%
Barcelona nord	3017	474154	0,6%	61,4%	59,3%
Barcelona sud	3241	460129	0,7%	71,5%	42,2%
Camp de Tarragona	241	120933	0,2%	60,8%	59,5%
Catalunya central	599	158932	0,4%%	66,1%	52,9%
Girona	685	56167	1,2%	70,6%	29,0%
Lleida	736	128338	0,6%	70,7%	69,3%
Terres de l'Ebre	234	70856	0,3%	67,2%	40,8%

A partir de estos datos, se puede determinar una relación directa entre el número de pacientes con citologías positivas en algún tipo de ASCUS y los porcentajes de positividad de VPH, obteniéndose una media de 52,24% de VPH positivos a partir de pacientes con citologías positivas.

## **4. Hipótesis y objetivos**

### **4.1 Hipótesis**

Existe una correlación entre los datos de mujeres infectadas por VPH en las regiones sanitarias de Cataluña y las tendencias epidemiológicas globales de este tipo de infección así como las analizadas y diagnosticadas en Eldine Patología.

### **4.2 Objetivos**

- Recopilar información sobre los diferentes tipos de pruebas utilizados para la detección del VPH en Eldine Patología.
- Realizar una extracción de datos de casos positivos de VPH en las regiones sanitarias de Cataluña en las que opera Eldine Patología.
- Correlacionar los datos de cada una de estas regiones con las estadísticas publicadas, tanto a nivel de Cataluña como a nivel global.

## 5. Material y métodos

### 5.1 Criterios de inclusión de los casos de estudio

Los casos que se han seleccionado corresponden con muestras de pacientes de diferentes servicios de ginecología, con diagnóstico molecular y analizadas en Eldine Patología entre 01/01/2013 y 31/12/2022 con resultado positivo.

Las variables de interés son:

- Tipo de prueba molecular realizada.
- Genotipo del VPH detectado, en los casos en los que la técnica de detección utilizada lo permita.
- Área geográfica del centro médico del que proviene la muestra, lo que permitirá correlacionar los datos obtenidos con la bibliografía.
- Edad de la paciente, para comprobar la prevalencia de VPH en diferentes rangos de edad.

La extracción de datos siguiendo los criterios comentados aporta un total de 1935 resultados, entre los que se pueden encontrar resultados positivos en VPH y resultados positivos en algún tipo de enfermedad de transmisión sexual.

En este caso, los datos de mayor relevancia y a partir de los cuales se realizará un estudio estadístico son aquellos positivos en cualquier genotipo de VPH. Estos han sido clasificados previamente según la técnica a partir de la cual han sido obtenidos y según la región sanitaria de Cataluña a la que pertenecen los centros médicos de los que provienen las muestras, siguiendo un patrón de colores:

Tabla 6. Regiones sanitarias de Cataluña de las que se han obtenido resultados positivos de VPH.

Región sanitaria	Color asignado
Camp de Tarragona	Naranja
Terres de l'Ebre	Azul
Barcelona Sud	Verde
Lleida	Amarillo

De los 1935 casos se eliminan 175 por no adaptarse a los criterios de estudio. 726 casos han sido analizados utilizando la KIT AmpliPAP-HPV ®, 485 QIAscreen PCR test ®, 132 por PCR Cobas ®, y 427 utilizando Captura de Híbridos 2 ®.

Finalmente el grupo de estudio se conforma por 1770 pacientes con una media de edad de 36,8 años.

## **5.2 Análisis estadístico**

Se realizará un análisis estadístico que determine la relación entre la edad de la paciente, la procedencia y los genotipos de VPH.

Se ha visto que existe una mayor incidencia de infección por VPH en mujeres jóvenes de entre 20 y 30 años. No se han obtenido datos globales que relacionen el genotipo de VPH diagnosticado con la edad de la paciente, aún así se puede estudiar si existe algún tipo de relación entre estos factores en los casos extraídos de la base de datos de Eldine Patología.

Para determinar la relación entre la edad de la paciente y el genotipo de VPH detectado se realiza una prueba t y z (t de Student) que se encarga de comparar las medias de los valores de cada grupo. Si la media de edad de pacientes que no tienen un determinado genotipo de VPH es similar a la media de edad de pacientes con diagnóstico positivo, podemos concluir que no existe una correlación estadística entre la edad y el genotipo (valor-p > 0,05). Esta prueba se realiza cuando una variable es numérica (edad) y la otra no (genotipo de VPH; 0 = negativo, 1= positivo) y la realizaremos con los datos obtenidos de las técnicas PCR Cobas ®, KIT AmpliPAP-HPV ® y QIAscreen PCR test ®.

Por otro lado, los valores de RLU obtenidos en la técnica de Captura de Híbridos 2 ® son directamente proporcionales a la carga viral presente en la muestra, como se ha comentado anteriormente el 90% de los casos con un valores superiores a 100 RLU se asocian a lesión cervical. A partir de un test ANOVA, que sigue el mismo principio que el anterior pero comparando más de dos medias, en este caso tres ya que los datos obtenidos por esta técnica se clasifican en tres grupos (1 = niveles entre 0-10 RLU, 2 = niveles entre 10-100

RLU y 3 = niveles superiores a 100 RLU), se puede buscar la relación entre la edad de las pacientes y los valores de RLU obtenidos.

Por último, para determinar la correlación entre el área sanitaria de Cataluña (Camp de Tarragona = 1, Terres de l'Ebre = 2, Barcelona Sud = 3 y Lleida = 4) de la que procede la muestra y el genotipo de VPH diagnosticado se realiza un test de independencia no numérica. Esta prueba permite determinar si existe o no relación entre los diferentes grupos (si el valor-p < 0,05 existe correlación entre el área sanitaria de Cataluña y el genotipo de VPH diagnosticado).

También se realiza un análisis comparativo que relaciona la incidencia global, la incidencia de las diferentes áreas sanitarias de Cataluña y la incidencia de positivos diagnosticados en Eldine Patología con la edad y procedencia de las pacientes.

## 6. Resultados y discusión

### 6.2 Resultado del análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes pruebas estadísticas podemos concluir que no existe correlación entre la edad de las pacientes y los diferentes genotipos de VPH. Cuanto menor sea el valor-p, mayor es la tendencia a la correlación entre las variables, aún así esto no es significativo a menos que el valor-p sea menor de 0,05. Por otro lado, el valor-p obtenido a partir de la técnica KIT AmpliPAP-HPV® para la correlación entre la edad y los genotipos 16 y 18, sin llegar a ser menor de 0,05, es lo suficientemente bajo como para indicar posibles diferencias significativas entre las medias de edad de cada grupo.

Tabla 7. Resultados (valor - p) de la prueba t y z para la comparación de una media numérica (edad) y otra no numérica (genotipo de VPH).

Técnica de detección de VPH	Valor – p
QIAscreen PCR test®	Edad – VPH 16: 0,1169 Edad – VPH 18: 0,7278 Edad – otros VPH: 0,8515
KIT AmpliPAP-HPV®	Edad – VPH 16: 0,1044 Edad – VPH 18: 0,0651 Edad – otros VPH: 0,4206
PCR Cobas®	Edad – VPH 16: 0,6473 Edad – VPH 18: 0,7942 Edad – otros VPH: 0,1856

Tabla 8. Resultado (valor - p) del test ANOVA para la correlación entre la edad y los valores de RLU de la técnica de Captura de Híbridos 2®.

Técnica de detección de VPH	Valor – p
Captura de Híbridos 2®	Edad– RLU < 10: 0,2509 Edad – RLU 10-100: 0,2509 Edad – RLU > 100: 0,2509

Con respecto a la procedencia y los diferentes genotipos de VPH tampoco se puede asegurar que exista una correlación directa para los resultados de PCR Cobas®, KIT AmpliPAP-HPV® y QIAscreen PCR test®. Teniendo en cuenta que el valor-p tiene que ser menor a 0,05 para que se considere significativo, se podría pensar que en los resultados obtenidos de la técnica PCR Cobas® la procedencia y el genotipo 18 de VPH pueden estar relacionados. En este caso no es fiable ya que existen muy pocos valores de VPH 18 en los datos extraídos de la bases de datos de Eldine Patología detectados a través de esta técnica, por lo que se considera que el resultado del valor-p está distorsionado.

En el caso de los resultados de la técnica Captura de Híbridos 2®, si que se podría relacionar la procedencia con los valores de RLU, determinándose así que existe una tendencia a resultados con una RLU > 10 tanto en el área sanitaria de Camp de Tarragona como en Terres de l'Ebre. Sobre todo, se observa una mayor cantidad de datos de RLU > 100 en ambas procedencias, estos valores se asocian en un 90% de los casos a lesiones cervicales.

Tabla 9. Resultados (valor – p) del test de independencia para la correlación entre los datos de procedencia de la muestra y el genotipo detectado (QIAscreen PCR test®, KIT AmpliPAP-HPV® y PCR Cobas®), y resultados del test de independencia entre los datos de procedencia de la muestra y valores de RLU de la técnica de hibridación por captura.

<b>Técnica de detección de VPH</b>	<b>P - value</b>
QIAscreen PCR test®	Procedencia – VPH 16: 0,6352 Procedencia – VPH 18: 0,8812 Procedencia – otros VPH: 0,6043
KIT AmpliPAP-HPV®	Procedencia – VPH 16: 0,1548 Procedencia – VPH 18: 0,7581 Procedencia – otros VPH: 0,5199
PCR Cobas®	Procedencia – VPH 16: 0,5052 Procedencia – VPH 18: 0,0259 Procedencia – otros VPH: 0,4263
Captura de Híbridos 2®	Procedencia – RLU: 0,0078

La edad media de las pacientes con diagnóstico positivo es de 36,8 años, esto demuestra que, como señala la bibliografía, la positividad disminuye con la edad, habiendo poca representación de pacientes mayores de 60 años.

Los resultados de todos los análisis estadísticos están detallados en el Anexo 11.4.

## 6.2 Resultado del análisis comparativo

Tabla 10. Tabla comparativa de la incidencia global, la incidencia de Cataluña y la incidencia de los datos extraídos de Eldine Patología.

<b>Procedencia</b>	<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>Edad</b>
Europa	9% - 29,1%	20 – 30 años
América del norte	4% - 20%	20 – 30 años
África	17%- 34%	20 – 30 años
Asia y Oceanía	9,4%	20 – 30 años
Sudamérica	20,4%	20 – 30 años
España	14%	20 – 30 años
Cataluña	8,26%	25 – 39 años
Eldine Patología	28,34%	36,83 años

Se puede observar que el porcentaje de positivos es más elevado cuando se trata de los datos extraídos de la base de datos de Eldine Patología. Esto se debe a que los resultados han sido obtenidos de pacientes cuyas citologías eran anormales, y por tanto, existía sospecha de una posible infección por VPH. Por otro lado, los resultados extraídos de la bibliografía se basan en datos de

programas de cribado, por lo que las pacientes previamente no tenían indicios de la infección.

Por lo que respecta a la edad, las pacientes cuyas muestras han sido analizadas en Eldine patología se encuentran dentro del rango de edades en el que predominan las infecciones por VPH en Cataluña, siendo un poco más elevada que en el resto de procedencias estudiadas, aún así no se considera una diferencia significativa.

Tabla 11. Tabla comparativa de la incidencia bibliográfica en las regiones sanitarias de Camp de Tarragona y Terres de l'Ebre y la incidencia de los datos extraídos de Eldine Patología.

<b>Región sanitaria de Cataluña</b>	<b>Casos totales de VPH</b>	<b>Población atendida</b>	<b>Porcentaje de positivos</b>	<b>Edad</b>
Camp de Tarragona (datos bibliográficos)	2200	81019	2,7%	25-39 años
Terres de l'Ebre (datos bibliográficos)	698	44052	1,6%	25-39 años
Camp de Tarragona (Eldine Patología)	835	2945	28,35%	36,33 años
Terres de l'Ebre (Eldine Patología)	689	2675	25,75%	37,56 años

Solo se realiza el análisis comparativo de las regiones sanitarias de Camp de Tarragona y Terres de l'Ebre porque son de las que se han obtenido datos significativos. En Barcelona Sud y Lleida Eldine Patología lleva operando pocos años, y por tanto, no existe una base de datos comparable a la bibliográfica.

Como se ha comentado anteriormente, el porcentaje de positivos aumenta bastante en Eldine Patología debido a que se hace la prueba como método de confirmación de diagnóstico y no como proceso de cribado. Aún así, se puede ver como en Camp de Tarragona el porcentaje sigue siendo más elevado que en Terres de l'Ebre, correspondiéndose a la tendencia observada en la bibliografía. Los valores de la edad siguen entrando dentro del rango esperado según bibliográficamente.

## **7. Conclusiones**

Existen múltiples técnicas para la detección del VPH que permiten un diagnóstico preciso y relativamente rápido de diferentes genotipos del virus, normalmente de aquellos de alto riesgo a progresar a algún tipo de lesión cervical secundaria premaligna.

A partir de los datos extraídos de la base de datos de Eldine Patología se puede concluir que la edad de las pacientes es un factor de riesgo, siendo aquellas mayores de 60 años menos propensas a un diagnóstico positivo. Aún así, no se puede correlacionar significativamente la procedencia de las muestras con la edad de la paciente ni con el tipo de VPH detectado.

Los datos obtenidos de las diferentes áreas sanitarias de Cataluña se corresponden con los datos obtenidos bibliográficamente con respecto a la edad. Si se comparan los porcentajes de positividad se observa un aumento notable en los datos procedentes de Eldine Patología debido a que las muestras provienen de pacientes cuyas citología muestran indicios de una posible infección por VPH, a diferencia del resto de datos que provienen de programas de cribado.

## **8. Autoevaluación**

Haber realizado las prácticas curriculares y el trabajo de fin de grado en Eldine Patología ha sido una experiencia que me ha proporcionado tanto crecimiento personal como profesional. He aprendido y puesto en práctica muchos de los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del grado de Biotecnología, además de aprender acerca del campo de la anatomía patológica y todo lo que ello conlleva.

He podido comprobar como el trabajo dentro de un laboratorio es un trabajo interdisciplinar (citotécnicos, biotecnólogos, médicos, informáticos y administrativos) y la comunicación y el trabajo en equipo son factores muy importantes para que el trabajo se pueda llevar a cabo.

He aprendido mucho sobre el virus del papiloma humano y la gran repercusión que tiene sobre la salud, sobre todo con la que respecta al área ginecológica y como un diagnóstico temprano y un posterior seguimiento pueden prevenir posibles progresiones a distintos tipos de cáncer. Además de obtener experiencia en pruebas de detección del VPH y otros tipos de pruebas moleculares que se realizan diariamente en el laboratorio de Eldine Patología.

## 9. Bibliografía

- Álvarez García, F. J., Cilleruelo Ortega, M. J., Álvarez Aldeán, J., Garcés-Sánchez, M., Garrote Llanos, E., Iofrío de Arce, A., Montesdeoca Melián, A., Navarro Gómez, M. L., Pineda Solas, V., Rivero Calle, I., Ruiz-Contreras, J., & Serrano Marchuet, P. (2022). Immunisation schedule of the Pediatric Spanish Association: 2022 recommendations. *Anales de Pediatría*, *96*(1), 59.e1-59.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2021.11.003>
- Araldi, R. P., Sant'Ana, T. A., Módolo, D. G., de Melo, T. C., Spadacci-Morena, D. D., de Cassia Stocco, R., Cerutti, J. M., & de Souza, E. B. (2018). The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *106*, 1537–1556. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.06.149>
- de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *47*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2017.08.015>
- Diagnóstico del cáncer de cuello uterino - NCI*. (n.d.). Retrieved June 2, 2023, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/diagnostico>
- Dreyer, G. (2018). Clinical implications of the interaction between HPV and HIV infections. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *47*, 95–106. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2017.08.011>
- Fera, A. N. Della, Warburton, A., Coursey, T. L., Khurana, S., McBride, A. A., & Sugden, B. (2021). *Persistent Human Papillomavirus Infection*. <https://doi.org/10.3390/v13020321>
- Gadducci, A., Cosio, S., & Fruzzetti, F. (2020). Estro-progestin Contraceptives and Risk of Cervical Cancer: A Debated Issue. *Anticancer Research*, *40*(11), 5995–6002. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14620>
- Graham, S. V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clinical Science (London, England : 1979)*, *131*(17), 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>
- HPV INFORMATION CENTRE*. (n.d.). Retrieved November 22, 2022, from <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/anemia/anemia-por-deficiencia-de-vitamina-b12>

- Kamal, M. (2022). Cervical Pre-cancers: Biopsy and Immunohistochemistry. *CytoJournal*, 19. [https://doi.org/10.25259/CMAS\\_03\\_13\\_2021](https://doi.org/10.25259/CMAS_03_13_2021)
- Khieu, M., & Butler, S. L. (2023). High Grade Squamous Intraepithelial Lesion. *StatPearls*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28613479/>
- Levi, A. W., Bernstein, J. I., Hui, P., Duch, K., Schofield, K., & Chhieng, D. C. (2016). A Comparison of the Roche Cobas HPV Test With the Hybrid Capture 2 Test for the Detection of High-Risk Human Papillomavirus Genotypes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140(2), 153–157. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2015-0027-OA>
- Okunade, K. S. (2020). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 40(5), 602. <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
- Park, Y., Lee, E., Choi, J., Jeong, S., & Kim, H.-S. (2012). Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 Assays to Direct Sequencing and Genotyping of HPV DNA. <https://doi.org/10.1128/JCM.00337-12>
- Pimple, S., & Mishra, G. (2022). Cancer cervix: Epidemiology and disease burden. *CytoJournal*, 19. [https://doi.org/10.25259/CMAS\\_03\\_02\\_2021](https://doi.org/10.25259/CMAS_03_02_2021)
- Scott-Wittenborn, N., & Fakhry, C. (2021). Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Seminars in Radiation Oncology*, 31(4), 286–296. <https://doi.org/10.1016/J.SEMRADONC.2021.04.001>
- Sitarz, K., & Szostek, S. (2019). Food and Drug Administration-approved molecular methods for detecting human papillomavirus infection. *Ginekologia Polska*, 90(2), 104–108. <https://doi.org/10.5603/GP.2019.0018>
- SIVES 2020. (n.d.). Retrieved November 8, 2022, from <http://identitatcorporativa.gencat.cat/ca/aplicacions/papereria>
- Vahteristo, M., Heinävaara, S., Anttila, A., & Sarkeala, T. (2022). Alternative cytology triage strategies for primary HPV screening. *Gynecologic Oncology*, 167(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2022.07.023>
- Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H. U., Chan, P. K. S., Desalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, A. A., Villa, L. L., & Burk, R. D. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *The Journal of General Virology*, 99(8), 989–990. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001105>

Varl, J., Ivanus, U., Marinsek, Z. P., Jerman, T., Valencak, A. O., Poljak, M., & Prevodnik, V. K. (2019). Clinical relevance of the borderline results of the Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA assay with cervical samples collected in Specimen Transport Medium. *Radiology and Oncology*, 53(3), 316–322. <https://doi.org/10.2478/RAON-2019-0044>

## **10. Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Lluís Pons Ferré y a la Dra. Àngels Fortunyo Mar por haberme ofrecido hacer este trabajo en Eldine Patología y por toda la implicación que ello conlleva.

A Helena Perez por haberme guiado a lo largo de la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Josep Maria Mateo Sanz, por su ayuda con el análisis estadístico e interpretación de resultados.

Por último, quiero agradecer a mi familia, por su confianza y apoyo incondicional durante todos estos años.

## 11. Anexos

### 11.1 Protocolo de extracción de ADN en EZ1

- Preparación de solución madre de CARRIER:

La primera vez que se abre el kit es necesario disolver el CARRIER liofilizado en 310 µl de tampón de elución (AVE).

- Preparación de solución CARRIER-AVE:

Para cada carrera de EZ1 hay que preparar una mezcla de solución madre de CARRIER y tampón de elución AVE que dependerá del número de muestras, el objetivo es obtener 60 µl de solución CARRIER-AVE para cada muestra (3,6 µl de CARRIER + 56,4 µl de AVE).

Tabla 12. Preparación de la solución CARRIER-AVE en relación con el número de muestras.

<b>Nº de muestras</b>	<b>de Solución madre CARRIER (µl)</b>	<b>Tampón de elución AVE (µl)</b>
1	3,6	56,4
2	7,2	112,8
3	10,8	169,2
4	14,4	225,6
5	18,0	282,0
6	21,6	338,4
7	25,2	394,8
8	28,8	451,2
9	32,4	507,6
10	36,0	564,0
11	39,6	620,4
12	43,2	676,8
13	46,8	733,2
14	50,4	789,6

## 11.2 Protocolo de QIAscreen PCR Test ®

- Preparación de los tubos:

Se añaden 15 µl de “QIAscreen Master Mix” en los tubos de PCR (máximo 72 tubos por run de RT-PCR).










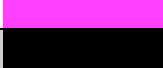










- En la posición 1 de los tubos se añaden 5 µl del “QIAscreen Positive Control”. Mezclando previamente mediante pipeteo ascendente y descendente.
- En el resto de los tubos se añaden 5 µl de muestra de ADN purificado anteriormente, de la misma manera que en el tubo en posición 1.
- Interpretación de resultados:
  - VPH positivo. Para VPH 16 o 18  $CT < 36$ , para otros VPH  $CT < 33,5$ . El valor de CT de la  $\beta$ -globina no es importante en este caso.
  - VPH negativo. Los valores de CT para VPH 16 o 18 son  $\geq 30$  o no se observa señal y para otros VPH  $\geq 33,5$  o no se observa señal. La CT de la  $\beta$ -globina es  $\leq 30$ .
  - Resultado no válido. Los VPH 16 y 18 tienen valores de  $CT \geq 36$  o sin señal y otros VPH  $CT \geq 33,5$  o sin señal. El valor de CT de la  $\beta$ -globina en este caso tiene que ser  $> 30$ .
- Criterio de validación del control positivo:

Un control positivo óptimo deberá alcanzar una  $CT < 29$  para el canal fluorescente de la  $\beta$ -globina humana,  $CT < 30$  para los VPH 16 y 18 y  $CT < 32$  para otros tipos de VPH de alto riesgo.

El resultado de las muestras se determina a partir de la referencia de la fluorescencia más alta, el control positivo. Si no cumple con las características preestablecidas y los ajustes del análisis son correctos, los resultados no se considerarán válidos y se tendrá que repetir el experimento.

### 11.3 Ejemplo resultados QIAscreen PCR test ®

Tabla 13. CTs de cada uno de los canales analizados en las figuras de la 14 a la 21.

Nº	Color	Nombre	Canal naranja	Canal verde	Canal rojo	Canal amarillo
1		Control +	26,16	25,94	25,50	28,63
2		8232	28,49	NEG	NEG	NEG
3		8292	27,26	NEG	NEG	NEG
4		8298	24,87	NEG	NEG	NEG
5		8332	28,69	NEG	NEG	NEG
6		8333	26,30	NEG	23,91	NEG
7		8334	25,27	NEG	NEG	NEG
8		8336	38,21	NEG	NEG	NEG
9		8348	26,69	NEG	NEG	NEG
10		8361	29,88	NEG	NEG	30,65
11		8362	24,78	NEG	NEG	27,59
12		8363	25,24	NEG	NEG	NEG
13		8364	27,86	NEG	NEG	NEG
14		8365	27,11	NEG	NEG	NEG
15		8366	22,59	NEG	NEG	NEG
16		8367	27,07	NEG	NEG	NEG
17		8368	25,47	NEG	NEG	NEG
18		8369	27,12	NEG	NEG	NEG
19		8370	26,56	NEG	NEG	NEG
20		8372	28,45	NEG	NEG	24,30
21		8373	30,92	NEG	NEG	23,60
22		8374	29,16	32,18	NEG	34,50

23		8385	21,13	NEG	NEG	NEG
24		8387	25,20	NEG	NEG	NEG
25		8388	27,04	NEG	NEG	31,24
26		8390	22,26	NEG	NEG	NEG
27		8395	23,93	NEG	NEG	NEG
28		8397	23,77	NEG	NEG	26,97
29		8398	23,95	NEG	NEG	NEG
30		8400	19,51	NEG	NEG	NEG
31		8403	28,13	NEG	NEG	NEG
32		8405	26,83	NEG	NEG	NEG
33		8406	28,73	NEG	NEG	NEG
34		8407	27,28	NEG	NEG	NEG
35		8407	26,73	NEG	NEG	NEG
36		8409	33,93	NEG	NEG	NEG
37		8386	30,88	NEG	NEG	NEG
38		8340	29,51	NEG	NEG	NEG
39		8314	29,59	28,68	NEG	NEG

## 11.4 Tablas estadísticas

Tabla 14. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con QIAScreen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-0,4482; 4,0031]

Diferencia	1,7774
t (Valor observado)	1,5752
t  (Valor crítico)	1,9724
DF	191,5645
Valor-p (bilateral)	0,1169
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 15. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con QIAScreen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-4,0351; 2,8203]

Diferencia	-0,6074
t (Valor observado)	-0,3482
t  (Valor crítico)	1,9650
DF	472
Valor-p (bilateral)	0,7278
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no

podemos rechazar la hipótesis nula  $H_0$ .

Tabla 16. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con QIAScreen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-2,4734; 2,9948]

Diferencia	0,2607
t (Valor observado)	0,1874
t  (Valor crítico)	1,9650
DF	472
Valor-p (bilateral)	0,8515
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

$H_0$ : La diferencia entre las medias es igual a 0.

$H_a$ : La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula  $H_0$ .

Tabla 17. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 16 detectado con QIAScreen.

Tabla de contingencia (Procedencia / VPH 16):

	VPH 16-0	VPH 16-1
Campo de Tarragona	114	26
Tierras del Ebro	188	49
Barcelona Sur	64	22
Lleida	18	4

Test de independencia entre procedencia y VPH 16:

Chi-square (Valor observado)	1,7077
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,6352
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 18. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia y VPH 18 detectado con QIAscreen.

Tabla de contingencia (Procedencia / VPH 18):

	VPH 18-0	VPH 18-1
Campo de Tarragona	128	12
Tierras del Ebro	213	24
Barcelona Sur	77	9
Lleida	19	3

Test de independencia entre procedencia y VPH 18:

Chi-square (Valor observado)	0,6660
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,8812
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 19. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia y otros genotipos de VPH detectados con QIAscreen.

Tabla de contingencia (Procedencia / VPH otros):

	VPH otros-0	VPH otros-1
Campo de Tarragona	19	121
Tierra del Ebro	45	192
Barcelona Sur	15	71
Lleida	4	18

Test de independencia entre procedencia y otros genotipos de VPH:

Chi-square (Valor observado)	1,8492
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,6043
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 20. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con Ampligen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-0,2666; 2,8305]

Diferencia	1,2820
t (Valor observado)	1,6275
t  (Valor crítico)	1,9659
DF	400,0926
Valor-p (bilateral)	0,1044
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 21. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con Ampligen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-0,2027; 6,6828]

Diferencia	3,2400
t (Valor observado)	1,8477
t  (Valor crítico)	1,9634
DF	701
Valor-p (bilateral)	0,0651
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 22. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con Ampligen.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-1,0527; 2,5111]

Diferencia	0,7292
t (Valor observado)	0,8071
t  (Valor crítico)	1,9725
DF	190,8098
Valor-p (bilateral)	0,4206
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula  $H_0$ .

Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 16 detectado con Ampligen.

Tabla de contingencia (Procedencia/ VPH 16):

	VPH 16-0	VPH 16-1
Campo de Tarragona	395	152
Tierras del Ebro	35	6
Barcelona Sur	90	43
Lleida	3	2

Test de independencia entre procedencia y VPH 16:

Chi-square (Valor observado)	5,2438
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,1548
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

$H_0$ : Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

$H_a$ : Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula  $H_0$ .

Tabla 23. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 18 detectado con Ampligen.

Tabla de contingencia (Procedencia/ VPH 18):

	VPH 18-0	VPH 18-1
Campo de Tarragona	521	26
Tierras del Ebro	40	1
Barcelona Sur	125	8
Lleida	5	0

Test de independencia entre procedencia y VPH 18:

Chi-square (Valor observado)	1,1790
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,7581
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

*Tabla 24. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y otros genotipos de VPH detectados con Ampligen.*

Tabla de contingencia (Procedencia/ otros VPH):

	VPH otros-0	VPH otros-1
Campo de Tarragona	89	458
Tierras del Ebro	7	34
Barcelona Sur	27	106
Lleida	0	5

Test de independencia entre procedencia y otros genotipos de VPH:

Chi-square (Valor observado)	2,2619
Chi-square (Valor crítico)	7,8147
DF	3
Valor-p	0,5199
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 25. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 16 detectado con PCR Cobas. .

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-5,4740; 3,4139]

Diferencia	-1,0300
t (Valor observado)	-0,4586
t  (Valor crítico)	1,9784
DF	130
Valor-p (bilateral)	0,6473
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 26. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y VPH 18 detectado con PCR Cobas.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:

[-12,4485; 9,5423]

Diferencia	-1,4531
t (Valor observado)	-0,2615
t  (Valor crítico)	1,9784
DF	130
Valor-p (bilateral)	0,7942
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 27. Prueba t para dos muestras independientes/ Prueba bilateral. Correlación entre edad de la paciente y otros genotipos de VPH detectados con PCR Cobas.

Intervalo de confianza para la diferencia entre las muestras de 95%:  
[-5,7040; 1,1404]

Diferencia	-2,2818
t (Valor observado)	-1,3459
t  (Valor crítico)	2,0185
DF	41,7181
Valor-p (bilateral)	0,1856
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es diferente de 0.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 28. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 16 detectado con PCR Cobas.

Tabla de contingencia (Procedencia/ VPH 16):

	VPH 16-0	VPH 16-1
Campo de Tarragona	29	7
Tierras del Ebro	72	24

Test de independencia entre procedencia y VPH 16 :

Chi-square (Valor observado)	0,4497
Chi-square (Valor crítico)	3,8415
DF	1
Valor-p	0,5025
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 29. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y VPH 18 detectado con PCR Cobas.

Tabla de contingencia (Procedencia/ VPH 18):

	VPH 18-0	VPH 18-1
Campo de Tarragona	33	3
Tierras del Ebro	95	1

Test de independencia entre procedencia y VPH 18:

Chi-square (Valor observado)	4,7373
Chi-square (Valor crítico)	3,8415
DF	1
Valor-p	0,0295
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis alternativa Ha.

Tabla 30. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y otros genotipos de VPH detectados con PCR Cobas.

Tabla de contingencia (Procedencia/ otros VPH):

	VPH otros-0	VPH otros-1
Campo de Tarragona	6	30
Tierras del Ebro	11	85

Test de independencia entre procedencia y otros VPH:

Chi-square (Valor observado)	0,6330
Chi-square (Valor crítico)	3,8415
DF	1
Valor-p	0,4263
alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es mayor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis nula H0.

Tabla 31. Prueba ANOVA. Correlación entre el valor de RLU observado en la prueba de hibridación por captura y la edad de la paciente.

Análisis de varianzas:

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Valor-p
Modelo	2	293,8009	146,9004	1,3871	0,2509
Error	420	44480,6294	105,9063		
Total	422	44774,4303			

Tabla 32. Tabla de contingencia y test de independencia. Correlación entre la procedencia de la muestra y valores de RLU observados en la prueba de hibridación por captura.

Tabla de contingencia (Procedencia/ RLU):

	RLU-1	RLU-2	RLU-3
Campo de Tarragona	21	19	72
Tierras del Ebro	75	90	150

Test de independencia entre procedencia y RLU:

Chi-square (Valor observado)	9,7158
Chi-square (Valor crítico)	5,9915

DF	2
Valor-p	0,0078
alfa	0,05

---

Interpretación de la prueba:

H0: Las filas y las columnas de la tabla son independientes.

Ha: Hay relación entre las filas y las columnas.

Como el valor-p calculado es menor que el nivel de significancia  $\alpha=0,05$ , no podemos rechazar la hipótesis alternativa Ha.