

Artículo Original/ Original Article

[10.18004/mem.iics/1812-9528/2024_e22122405](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2024_e22122405)

6 Comparación de técnicas moleculares de detección del virus del papiloma humano en muestras cervicales de mujeres paraguayas

*Verónica Villagra-Carrón¹ , Langjahr Patricia³ , Maria Liz Bobadilla¹ ,
Gladys Beatriz Olmedo¹ , Nelly Maldonado² 

¹Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social Asunción, Paraguay, Laboratorio Central de Salud Pública, Departamento de Inmunología. Asunción, Paraguay

²Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Décimo Octava Región Sanitaria. Asunción, Paraguay

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Dirección de Investigaciones, Departamento de Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay

Editor Responsable: Florencia del Puerto . Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, San Lorenzo, Paraguay. Email: colepuerto@hotmail.com

**Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:**

Villagra V, Langjahr P, Bobadilla ML, Olmedo B, Maldonado N. Comparación de técnicas moleculares de detección del virus del papiloma humano en muestras cervicales de mujeres paraguayas. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2024; 22(1): e22122405.

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH) es causa necesaria pero no suficiente del cáncer de cuello uterino (CCU), cuarta causa de muerte en mujeres a nivel mundial. En nuestro país, la incidencia y mortalidad de CCU es de 30,6 y 16,7 por 100.000 mujeres, respectivamente; siendo un problema de salud pública. Los VPH son de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), asociados a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y bajo riesgo oncogénico (VPH-BR), relacionados a verrugas genitales. El objetivo fue comparar dos pruebas diagnósticas de detección de VPH, PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa, en la población estudiada. Se seleccionaron 218 muestras cervicales de mujeres paraguayas analizadas por PCR en tiempo real (Abbott), luego por PCR seguida de hibridación reversa (CLART HPV2) que detecta 35 tipos de VPH. Por este último método los tipos más frecuentes en infecciones simples fueron VPH-16 y VPH-18, de los VPH-AR. Dentro de los VPH- PAR (Probable Alto Riesgo) VPH-53 fue el más detectado y dentro de los VPH-BR, VPH-84. El VPH-6 (de BR) se detectó solo en una muestra en forma simple y en 3 infecciones múltiples. La concordancia para detección de VPH-AR, comparando ambos métodos, fue 78,44 %, con coeficiente kappa de 0,50; IC 95% (0,38-0,62), similar a lo reportado en estudios de otros países. Este estudio aporta datos de PCR seguida de hibridación reversa como apoyo al tamizaje por PCR en tiempo real ya que la genotipificación monitorea infecciones tipo específicas persistentes que causan NIC contribuyendo a estudios epidemiológicos y vacunales.

Palabras clave: VPH-AR (Virus papiloma humano de alto riesgo), cáncer de cuello uterino (CCU), Pruebas diagnosticas.

Recepción: 25 de marzo 2024. **Revisión:** 07 de junio de 2024. **Aceptación:** 21 de noviembre de 2024.

***Autor correspondiente:** Verónica Villagra. Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS). Asunción, Paraguay.
Email: vevillagra@yahoo.com



Comparison of molecular techniques for the detection of the of human papillomavirus in cervical cell samples from Paraguayan women

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is a necessary but insufficient cause of cervical cancer (CC). It is, the fourth leading cause of death in women worldwide. In our country, the incidence and mortality of CC is 30.6 and 16.7 per 100,000 women, respectively. Therefore, it is a public health problem. HPV can be of high oncogenic risk (HR-HPV), associated with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and low oncogenic risk (LR-HPV), related to genital warts. The objective was to compare two diagnostic tests for HPV detection, real-time PCR and PCR followed by reverse hybridization, in the studied population. We selected 218 cervical samples from Paraguayan women analysed by real-time PCR (Abbott), then by PCR followed by reverse hybridization (CLART HPV2) which detects 35 HPV types. By the latter method, the most frequent types in single infections were HPV-16 and HPV-18, of the HR-HPVs. Among the HR-HPVs, HPV-53 was the most frequently detected and among the LR-HPVs, HPV-84. HPV-6 (LR-HPV) was detected in only one single sample and in 3 multiple infections. The concordance for HR-HPV detection, comparing both methods, was 78.44%, with a kappa coefficient of 0.50; 95% CI (0.38-0.62), similar to that reported in studies from other countries. This study provides PCR followed by reverse hybridization data in support of real-time PCR screening as genotyping monitors persistent type-specific infections that cause CIN as well as contributing to epidemiological and vaccine studies.

Keywords: HR-HPV (High-risk human papillomavirus), cervical cancer (CC), Diagnostic Tests.

INTRODUCCIÓN

El Virus Papiloma Humano (VPH) se transmite principalmente por contacto sexual siendo la infección de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial. Generalmente el sistema inmunitario elimina el virus, pero en algunos casos la infección persiste y puede provocar neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 1,2 y/o 3 (NIC 1,2 y 3), así como CCU y cánceres de cabeza y cuello. Además, los cánceres anogenitales, incluidos los de vagina, vulva, pene y ano, representan un subconjunto de cánceres relacionados con el VPH⁽¹⁾. El conocimiento de la historia natural del VPH ha contribuido a la prevención del CCU con el desarrollo de vacunas y la mejora de las estrategias de tamizaje o cribado⁽²⁾. La estrategia global de Organización Mundial de la Salud (OMS) propone la reducción del CCU como problema de salud pública, buscando que todos los países alcancen una tasa de incidencia de menos de 4 casos por 100 000 mujeres por año. Para conseguirlo, de aquí a 2030 deben alcanzarse los objetivos de alta cobertura en la vacunación contra el VPH, la detección y el tratamiento de las lesiones precancerosas y el tratamiento del cáncer⁽³⁾. De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), los VPH de alto riesgo oncogénico (AR) en lesiones anogenitales son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68; los de probable alto riesgo oncogénico (VPH-PAR): 26, 53, 73, y 82; y los VPH de bajo riesgo (VPH-BR): 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 85, y 89. Los tipos 16 y 18 son los más prevalentes en el CCU invasivo^(4,5). El CCU es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo⁽⁶⁾. Paraguay presenta una alta tasa de incidencia y mortalidad de CCU de 30,6 y 16,7 por 100.000 mujeres, respectivamente⁽⁷⁾. Las pruebas de VPH para tamizaje primario de CCU son más sensibles que la citología cervical^(8,9,10). Los programas de tamizaje del CCU deben adoptar una prueba de VPH solo si ha sido validada clínicamente demostrando una sensibilidad reproducible y constantemente alta para detectar lesiones NIC2+ y NIC3+, y detección mínima de infecciones del VPH irrelevantes y transitorias⁽¹⁰⁾. En Paraguay el programa de vacunación contra el VPH inició en el

año 2013, en una cohorte de niñas de 9 a 11 años, así como la implementación de pruebas de VPH como tamizaje en centros de salud seleccionados^(11,12,13). Se recomienda tipificar el VPH 16 y 18 para identificar a las mujeres con mayor riesgo de CCU entre las que dan positivo al VPH^(2,5). El método basado en PCR en tiempo real de Abbott detecta individualmente los VPH-16 y VPH-18 y un pool de otros 12 tipos de VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, 66 y 68). La PCR seguida de hibridación reversa, utiliza cebadores consenso MY09/11 y es capaz de detectar 35 tipos de VPH : los de AR :16 ,18 ,31 ,33, 35, 39 45, 51, 52 ,56, 58, 59, 66 y 68 de BR 6 ,11, 40, 42, 43, 44 ,54 ,61, 62 70 ,71, 72, 81, 83 ,84 ,85 y 89 y de Probable alto riesgo 26 53, 73, 82 y ha demostrado ser útil en estudios epidemiológicos para mejorar el triaje de las mujeres positivas al VPH mediante la estratificación del riesgo de tipo único, y el seguimiento de la infección persistente aportando información sobre los tipos virales circulantes⁽¹⁴⁾. Diferentes tipos virales presentan riesgos distintos para la ocurrencia de lesiones NIC2+. Los tipos de VPH-AR 16/18/31/33/45/52/58 están asociados al 73,9% de las lesiones NIC2+. Estas diferencias pueden ser relevantes tanto para el manejo clínico como para el diseño de estrategias preventivas y estudios epidemiológicos y vacunales⁽¹⁵⁾. A pesar de que la proporción de VPH 16 y 18 asociados a CCU aparece en forma constante alrededor del mundo, la detección de otros tipos oncogénicos tanto de alto y bajo riesgo varía según la región geográfica, raza y edad, así como la incidencia de CCU^(16,17,18,19,20). En cuanto a los tipos de VPH circulantes en nuestro país, en un trabajo en 495 mujeres de 25 a 64 años sin citología anormal previa se detectó un 14,5% de VPH-AR, siendo el más frecuente VPH-16 (2,1%), seguido del VPH-31, 33, 58 y 66; el VPH-18 aparece en sexto lugar⁽²¹⁾. En un estudio reciente se observó un 18,8 % de positividad de VPH -AR en una población de mujeres paraguayas mayores de 30 años siendo el VPH-16 el más prevalente⁽²²⁾. Otro estudio en población de Paraguay muestra que en mujeres con CCU que tenían infección única, el 59,4 % presentaban VPH-16 y el 12,5 % tenían VPH-18⁽²³⁾. Todo lo antedicho demuestra una gran circulación de infección de VPH-AR en nuestro país especialmente en mujeres no vacunadas⁽¹³⁾. Cabe destacar que desde el año 2021 el MSP del Paraguay resolvió mediante la resolución 1104/21 que el tamizaje de CCU se debe realizar con pruebas de VPH en mujeres mayores de 30 años^(24,25). La elección de una prueba apropiada para el cribado primario de CCU, así como en el seguimiento de mujeres con VPH positivo, se presenta como un desafío. La utilidad de comparar un método como PCR seguida de hibridación reversa que permite identificar separadamente varios genotipos ,con la metodología de PCR por tiempo real Abbott^(26,27), radica que ésta última es utilizada como screening y la PCR seguida de hibridación reversa identifica tipos específicos que sirven para tener datos epidemiológicos de la infección de VPH en mujeres paraguayas además de evaluar el desempeño de una prueba (PCR seguida de hibridación reversa) con respecto a otra ampliamente utilizada en tamizaje (PCR en tiempo real)^(14,28,29,30,31,32). Por estos motivos, se planteó como objetivo de este estudio comparar dos técnicas moleculares de detección de VPH, PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa en la población estudiada .

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población del estudio

El presente fue un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con componente analítico. Se seleccionaron al azar 218 muestras cervicales de mujeres paraguayas de diferentes regiones del país, que acudieron a servicios de Patología Cervical del Programa Nacional de Prevención del Cáncer de Cuello Uterino del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS) o colaboradores de éste, de octubre 2014 a octubre 2018, a realizarse cribado de CCU por prueba de Papanicolaou (Pap). Se les ofreció la prueba molecular de detección de VPH y aceptaron hacerse la prueba previa firma de un consentimiento informado. Se consideraron los siguientes criterios de inclusión: mujeres que acudían al servicio de Patología Cervical con orden médica de Pap y aceptaban realizarse la prueba de VPH, edad de 17 años o mayor, no referir CCU o lesiones premalignas, no

embarazadas y sin histerectomía total o parcial. La muestra se tomó por exfoliación del endocérnix usando un cepillo citológico y se colectó en medio *cervicollect* (Abbott, USA). Las muestras tomadas fuera de la capital del país fueron remitidas al Laboratorio Central de Salud Pública-MSPyBS en un plazo no mayor a 15 días y se encontraban correctamente etiquetadas y cerradas. El almacenamiento de las muestras se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron remitidos a los servicios de Patología Cervical y éstos se encargaron de dar el seguimiento correspondiente. En caso de resultados inválidos o con insuficiente muestra, se solicitó nueva muestra. En este estudio participaron mujeres cuyas muestras se recolectaron en un estudio aprobado por el Comité de Ética del Laboratorio Central de Salud Pública-MSPyBS. (Dictamen CEI-LCSP 49/280814). Las 218 muestras fueron analizadas primeramente por PCR en tiempo Real (Abbott) y luego por PCR seguida de hibridación reversa.

PCR en tiempo real

Se utilizó *High Risk VPH Real Time* (Abbott, USA), según las instrucciones del fabricante. Es un ensayo para la detección individual de VPH-16 y VPH-18 y detección agrupada de otros 12 tipos de VPH-AR: VPH-31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 y -68. Los cebadores o primers hibridan en la región L1, amplificando un producto de 150 pares de bases(pb). El control interno del proceso, diseñado para monitorear la calidad de la muestra, la extracción y amplificación de ADN, consiste en la amplificación de una región de 136 pares de bases del gen de la beta-globina humana. Los resultados fueron interpretados como "negativo", "VPH-16", "VPH-18", "otros VPH-AR" o la combinación de los tres últimos.

PCR seguida de Hibridación reversa

La detección y el genotipado del VPH se realizó utilizando el kit CLART HPV2 test (Genómica, Madrid, España). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se amplifica un fragmento de 450 pb en la región L1 del VPH por PCR utilizando cebadores biotinilados. El control de extracción de ADN genómico o control de ADN del paciente amplifica una región de 892 pb del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y para el control de amplificación de la PCR se usó un fragmento de 1202 pb de un plásmido transformado. Básicamente los productos amplificados por PCR y marcados con biotina hibridan con sus sondas complementarias específicas inmovilizadas en áreas bien definidas del microarreglo(microarrays).A continuación tienen lugar dos pasos de incubación secuenciales : primero con un conjugado de estreptavidina peroxidasa y segundo con un sustrato de 0-dianisidina.Seguidamente aparece un precipitado en aquellas regiones de microarray donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas Finalmente tiene lugar el análisis e interpretación automática de resultados gracias al lector CAR Lector de Arrays Clínicos (Genómica, Madrid, España) utilizando un programa informático diseñado y validado para tomar las imágenes de todos los pocillos. Todas las muestras con un resultado no válido (sin amplificación del control gen de CFTR y/o sin amplificación de plásmido CFTR) se sometieron a un nuevo examen, y el segundo resultado fue considerado definitivo. Los amplicones se detectaron mediante hibridación con sondas de ADN específicas para 35 tipos de VPH, los de AR :16 ,18 ,31 ,33, 35, 39, 45, 51, 52 ,56, 58, 59, 66 y 68) de BR 6 ,11, 40, 42, 43, 44 ,54 ,61, 62 70 ,71, 72, 81, 83 ,84 ,85 y 89 y de Probable alto riesgo 26, 53 ,73 y 82. La descripción resumida de las metodologías está en la Tabla 1.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron almacenados en una base de datos del programa Excel. Se utilizó el Programa GrafPad Prism versión 8.0 para el análisis. La frecuencia se expresó en porcentaje. La comparación de proporciones se realizó por chi cuadrado. La concordancia entre los métodos se analizó mediante el coeficiente kappa utilizando la prueba de McNemar. Para el cálculo de concordancia entre los métodos moleculares se consideró positivo para VPH-AR: i) por PCR en tiempo real, aquellas muestras positivas para simple o múltiples tipos de VPH-AR ("VPH-16", "VPH-18", "otros VPH-AR" o la combinación de los tres últimos); ii) por PCR seguida de

hibridación reversa, aquellas muestras positivas para uno o más VPH-AR, con o sin VPH-PAR y VPH-BR por PCR seguida de hibridación reversa.

Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Tabla 1. Ensayos de detección de VPH comparados en este estudio.

Test VPH	Genotipos de VPH detectados	Tecnología de detección	Gen de VPH blanco-ADN	Control interno del Proceso
PCR en tiempo real	VPH-16 y VPH-18 (individualmente) +	PCR en tiempo real	L1	β -globina
PCR seguida de Hibridación reversa	12 VPH-AR (<i>pool</i>) 14 VPH-AR+ 4 VPH-AR probable+ 17 VPH-BR (individualmente)	PCR + <i>microarray</i>	L1	*Gen CFTR humano (control de extracción de ADN genómico) *Plásmido modificado (control de PCR)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, VPH: virus papiloma humano, AR: alto riesgo, BR: bajo riesgo, CFTR: acrónimo de Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística).

RESULTADOS

Se seleccionaron al azar 67 muestras positivas y 151 negativas para VPH-AR que habían sido procesadas por PCR en tiempo real y se analizaron por PCR seguida de hibridación reversa (n total=218). En cuanto a caracteres socio demográficos la mayoría de las muestras pertenecían a mujeres entre 31 y 40 años y eran procedentes del Dpto. de Itapúa (Tabla 2). En el caso de las procesadas por PCR seguida de hibridación reversa las muestras también resultaron adecuadas ya que dieron positivo para amplicón de una región de 892 pb del gen CFTR humano demostrando la integridad del ADN (control de extracción de ADN genómico) y un fragmento de 1202 pb de un plásmido modificado (control de la reacción de PCR).

Tabla 2. Características demográficas de la población estudiada, n=218.

Edad	n	%
17- 20	13	6.0
21 -30	48	22.0
31 -40	90	41.3
41 -50	38	17.4
51- 60	25	11.5
Mayor a 60	4	1.8
Procedencia (Región Sanitaria)	n	%
XVIII (Capital Asunción)	91	41.7
XI (Central)	6	2.7
VII (Itapúa)	117	53.7
III (Cordillera)	1	0.5
XV (Pte. Hayes)	3	1.4

La *Tabla S1 (Material suplementario)* resume la cantidad de infecciones simples y múltiples y el tipo de VPH detectado por PCR seguida por hibridación reversa en las muestras estudiadas. En un total de 129 muestras no se detectó ADN de VPH por este método. En 89 (40,8%) muestras se detectó ADN del VPH siendo el 27,1 % infecciones simples y el 13,8 % infecciones múltiples. El más frecuente de AR fue el VPH 16 (8,7 %) el de PAR 53 (3,7%) y el de BR 81 (2,7 %). En las infecciones múltiples la combinación VPH-16 con VPH-31 fue la más frecuente. El VPH-6 (VPH-

BR) se detectó en una muestra en forma simple y en 4 infecciones múltiples. Se analizó la concordancia entre los métodos de PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa para VPH-AR. El porcentaje de concordancia fue de 78,44 % ($\kappa=0,50$, IC 95% 0,38-0,62) (Tabla 3). En total 218 muestras fueron analizadas por ambos métodos. Por PCR en tiempo real fueron positivas 67 muestras con un 30,7 % de positivos. La frecuencia más alta de infección por genotipo único fue de 3,7 % por el genotipo 16 y frecuencia más alta de infección múltiple de 2,3% (genotipos 16 y otros de alto riesgo (Tabla S2) (Material suplementario). Al analizar la concordancia entre los métodos de detección para tipos específicos, se encontró que para la detección de VPH-16, la concordancia entre el resultado por PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa fue de 95,41% ($\kappa=0,68$, IC 95% 0,50-0,87) y para la detección de VPH-18 fue de 93,1% ($\kappa=0,09$, IC 95% 0,12-0,30) (Tabla 4). La Tabla S3 (Material suplementario) describe los tipos de VPH en muestras positivas para VPH-AR por ambos métodos. Para el propósito de esta evaluación, los resultados de tipificación se clasificaron como: (a) concordantes, si el análisis arrojó genotipos idénticos o negativos por ambos ensayos, es decir si la PCR seguida de hibridación reversa da positiva para uno o más genotipos de los otros VPH-AR por la PCR en tiempo real, así como VPH 16 y/o VPH 18 (b) compatibles, si el resultado de la PCR seguida de hibridación reversa coincide parcialmente con uno de los resultados de la PCR en tiempo real. (c) discordante, si los resultados no concuerdan. En la Tabla 5 vemos que la mayor cantidad de positivos por PCR seguida de hibridación reversa y negativos por PCR en tiempo real correspondieron al tipo VPH-18.

Tabla 3. Concordancia entre PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa para la detección de VPH-AR, n=218.

PCR real time	PCR seguida de Hibridación reversa		% Concordancia	Coeficiente κ (IC 95%)
	VPH-AR Negativo	VPH-AR Positivo*		
VPH-AR Negativo	126 (57,8%)	25 (11,5%)	78,44%	0,50(0,38-0,62)
VPH-AR Positivo*	22 (10,1%)	45 (20,6%)		

*Incluye los tipos contenidos en PCR en tiempo Real

VPH: virus papiloma humano, AR: alto riesgo.

*Positivo-AR incluye muestras positivas para simple o múltiples tipos de VPH-AR, con o sin "otros VPH" o VPH-BR. Positivo Probable Alto Riesgo (PAR) por Hibridación reversa pero no contenidos en el test de PCR en tiempo real se computan como negativos.

Tabla 4. Concordancia entre los tests de PCR en tiempo real y PCR seguida de hibridación reversa para la detección de VPH-16 y VPH-18.

		PCR seguida de Hibridación Reversa		Total	% Concordancia	Coeficiente κ (IC 95%)
		VPH-16 Negativo	VPH-16 Positivo			
PCR en tiempo real	VPH-16 Negativo	196	7	203	95,41	0,68 (0,50-0,87)
	VPH-16 Positivo	3	12	15		
PCR en tiempo Real	VPH-18 Negativo	202	11	213	93,1%	0,09 (0,12 -0,30)
	VPH-18 Positivo	4	1	5		

Tabla 5. VPH-AR positivos por hibridación reversa y negativos por PCR en tiempo real. n=25.

Positivo VPH-AR (PCR seguida de Hibridación reversa)	Negativo VPH-AR* (PCR en tiempo real)	Interpretación	n
VPH-16	Negativo	Discordante	4
VPH-18	Negativo	Discordante	9
VPH-35	Negativo	Discordante	2
VPH-52	Negativo	Discordante	2
VPH-66	Negativo	Discordante	2
VPH-45	Negativo	Discordante	1
VPH-59	Negativo	Discordante	1
VPH-16, -31	Negativo	Discordante	1
VPH-16, -52, -66	Negativo	Discordante	1
VPH-16, -40(BR)	Negativo	Discordante	1
VPH-35, -51	Negativo	Discordante	1

*Tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

VPH: virus papiloma humano, AR: alto riesgo, BR: bajo riesgo.

DISCUSION

La PCR seguida por hibridación reversa presenta las siguientes ventajas: I) permite detectar infecciones y coinfecciones de los 35 tipos del virus con mayor importancia clínica (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89), II) la detección puede realizarse a partir de distintos tipos de muestras humanas: frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina. A nivel nacional existen trabajos en los cuales se reporta la utilización de PCR seguida de hibridación reversa, sin embargo, la misma fue realizada en Argentina^(21,23,33). Las frecuencias de VPH 16, VPH 18 y otros VPH-AR reportadas en el presente estudio son similares a la reportada en el estudio de Mendoza et. al en mujeres paraguayas⁽²³⁾. Los resultados de nuestro estudio son muy similares a los reportados en el estudio Horizon en el cual se usó la misma técnica de PCR seguida de hibridación reversa⁽²⁷⁾ en mujeres de 16 años a mayores de 65 años. Una diferencia con este estudio es que VPH-6 fue detectado en baja frecuencia. Esto puede ser debido a la diferente población estudiada o incluso a la diferente toma de muestra, ya que utilizando diferentes medios de recolección los puntos de corte para un resultado positivo optimizado para un medio de muestreo específico podría no ser óptimo para otro medio^(26,27,34).

La concordancia global en nuestro estudio para detección de VPH-AR, comparando PCR en tiempo real (Abbott) con PCR seguida de hibridación reversa (CLART® HPV2) fue de 78,44 %, que corresponde a una concordancia moderada, similar a lo reportado en la literatura para VPH-AR usando la metodología CLART® HPV2 y otra marca de PCR en tiempo real (70,3%)⁽³⁴⁾. Aunque se observó una concordancia mayor al 50 % en las muestras negativas, por ambos métodos (57,8 %) se observaron resultados discordantes en las muestras positivas (nivel de concordancia 20,6%) sobre todo en muestras con infecciones múltiples. Esto está descrito en la literatura⁽³⁵⁾. Otro estudio con metodologías similares de PCR seguida de hibridación reversa y PCR en tiempo real mostró una concordancia global entre ambos métodos del 80,8 % con coeficiente kappa 0,59 IC 95 % (0,52–0,66)⁽³⁶⁾, también similar a lo encontrado en este trabajo. La concordancia moderada podría deberse a varios factores. La detección del ADN del VPH podría estar influenciada por el método de extracción de ADN. Abbott utiliza extracción automatizada y CLART® HPV2 extracción manual en base a columnas cromatográficas. Por otro lado, ambos métodos pueden perder sensibilidad para detectar tipos de VPH en infecciones múltiples, por eso los fabricantes deben proporcionar más información sobre la sensibilidad analítica en la detección del tipo de VPH en infecciones únicas y múltiples por VPH, lo que resalta aún más la importancia de comparar las metodologías^(14,30,37). Además, la precisión de los resultados de las pruebas de VPH

utilizando ensayos de genotipado puede mejorar con la experiencia de un laboratorio con un ensayo en particular, y las diferencias entre los laboratorios pueden ser sustanciales^(14,38). La utilidad de comparar un método como PCR seguida de hibridación reversa que detecta individualmente tipos de VPH del pool de "otros de VPH-AR" que detecta la metodología Abbott⁽²⁶⁾ y otros tipos no contenidos en esta última tecnología, es lograr identificar correctamente prevalencias tipo específicas, presentando gran beneficio en estudios epidemiológicos y de tipos circulantes pre- y post-vacunales^(39,40). Obtuvimos resultados similares en nuestro estudio en la detección individual de VPH-16 y VPH-18, a un estudio en el cual se compara PCR en tiempo real y una prueba de hibridación similar a CLART® HPV2⁽³⁶⁾. En el caso de VPH-18, si bien el porcentaje de concordancia fue de 93,1%, el coeficiente kappa de 0,09 sugiere un pobre acuerdo entre ambas metodologías, debido a que varias muestras negativas por PCR en tiempo real dieron un resultado positivo por hibridación reversa. Este resultado se debería corroborar a futuro aumentando el tamaño de población que tenga ese genotipo (VPH-18). La mayor discordancia se da en el tipo 18, ya que 9 muestras detectados por hibridación reversa no fueron detectadas por PCR en tiempo real para este genotipo. Como proyección, sería interesante secuenciar la región amplificada del gen L1 en VPH-18 circulante en el país, ya que mutaciones puntuales en la secuencia que hibridan los primers puede afectar la detección del virus⁽⁵⁾. En una revisión realizada por De Thurah y col se evidenció que los diez ensayos disponibles comercialmente para VPH no detectan las mismas infecciones en mujeres sometidas a tamizaje primario. Esto se observó en una variedad de líquidos de muestreo y diferentes poblaciones⁽²⁶⁾. Al analizar la concordancia se debe tener en cuenta que el diseño del ensayo y la tecnología de detección viral son diferentes en las pruebas usadas; CLART® HPV2 usa hibridación reversa y Abbott® PCR en tiempo real. Esto puede ayudar a explicar la discordancia de ensayo observada, aunque ambos métodos apuntan a la región L1 del genoma viral para la detección del virus. Ensayos con amplicones más largos pueden dar menos resultados positivos de pruebas de VPH que usando amplicones más cortos, mientras que la homología de secuencia entre los genotipos del mismo grupo monofilético puede conducir a una reactividad cruzada (no intencionada) a genotipos de bajo riesgo^(26,28). En otros estudios comparando CLART® HPV2 y Abbott se encontró una muy buena concordancia en la detección de VPH-16 y VPH-18 en muestras recolectadas en tampón de fosfato salino (medio no comercial) y además se evidenció la pérdida de concordancia para detectar tipos de VPH en infecciones múltiples⁽³⁷⁾. En nuestro estudio utilizamos el medio comercial Abbott cervicollect para la detección del VPH, en ambas metodologías. La concordancia alcanzada por el método CLART de PCR seguida de hibridación reversa con respecto al de PCR en tiempo real aporta datos para usar la PCR seguida de hibridación reversa como apoyo al tamizaje primario por PCR en tiempo real ya que la genotipificación precisa es un importante indicador diagnóstico para monitorear las infecciones tipo específicas persistentes que son causa de NIC además de contribuir a estudios epidemiológicos y vacunales. También podemos concluir que existe una alta frecuencia de VPH-AR en la población estudiada (20,6 %) lo que subraya la importancia de realizar prevención mediante screening o tamizaje apropiado.

Asuntos éticos: En este estudio participaron mujeres cuyas muestras se recolectaron en un estudio aprobado por el Comité de Ética del Laboratorio Central de Salud Pública-MSPyBS. (Dictamen CEI-LCSP 49/280814).

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Financiamiento: Recursos Propios del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social así como una beca de Maestría en Ciencias Químico Biológicas, mención Biotecnología en el Marco del Programa Paraguayo para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología convocatoria 2017 (estudiante BENA06-14).

Contribución de autores:

Veronica Villagra: investigador principal y primer autor. Diseño de la investigación, análisis de datos, discusión, redacción y corrección del manuscrito.

Patricia Langjahr: coautora y tutora de la tesis. Análisis de datos.

Maria Liz Bobadilla: coautora y cotutora de tesis. Procesamiento de las muestras por Hibridación Reversa y contribución al diseño metodológico y revisión de la discusión.

Gladys Olmedo: coautora. Procesamiento de las muestras por PCR en tiempo real y análisis de datos.

Nelly Maldonado: coautora. Reclutamiento de pacientes y gestión en la toma de muestras y diseño metodológico.

DATOS DE AUTORES:

Veronica Villagra: bioquímica de la F.C.Q UNA. Maestría en Biotecnología por la Facultad de Ciencias Químicas de La UNA. Fue Jefa del Laboratorio de Referencia del Virus Papiloma Humano. Investigadora Principal por el MSPyBS del Proyecto ESTAMPA(IARC). Mención de honor en el Premio Nacional de Ciencias 2024. Actualmente es Bioquímica Investigadora del Laboratorio Nacional de referencia del VPH del MSPyBS. E mail: v.villagra2@gmail.com

Patricia Langjahr: Bioquímica de la F.C.Q UNA. Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Chile. Docente Investigador en el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas UNA (F.C.Q UNA). Presidente del Comité Autoevaluación de Postgrado de la F.C.Q UNA. Docente de Postgrado - Especialización en Reumatología Facultad de Ciencias Médicas de la UNA. E mail: plangjahr@gmail.com

Maria Liz Bobadilla: Bioquímica de la F.C.Q UNA. Maestría en Microbiología Molecular por la Universidad Nacional de San Martín, Argentina. Doctorado en Ciencias de la Salud por el Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, Brasil. Investigadora del Laboratorio Nacional de Referencia del VPH del MSPyBS. E Mail: bobadillaml@gmail.com

Gladys Olmedo: Bioquímica de la F.C.Q UNA. Diplomado en Metodología de la Investigación. Instituto Nacional de Salud Especialista en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Maestría en Ciencias. FioCruz. Fundación Oswaldo Cruz. Brasil. Se desempeñó como Bioquímica del Área Molecular del Laboratorio de Referencia de VPH. Actualmente es Bioquímica del Área Molecular del Departamento de Parasitología de Laboratorio Central de Salud Pública. E-Mail: beatrizolmedo@hotmail.com

Nelly Maldonado: Médica por la Facultad de Ciencias Químicas UNA. Especialista en Mastología y Cáncer de Cuello uterino. Fue Directora del Programa Nacional de Cáncer de Cuello Uterino y Mama del MSPyBS. Es Miembro de Sociedad Paraguaya de Cáncer. E Mail: nellyyelenmaldonado@hotmail.com

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of VPH-related cancers. *Cancer Biol Med.* 2020 Nov 15; 17(4): 864-78. [10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370](https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370)
2. Piña-Sánchez P. Human Papillomavirus: Challenges and Opportunities for the Control of Cervical Cancer. *Arch Med Res.* 2022 Dec; 53(8): 753-769. [10.1016/j.arcmed.2022.11.009](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.11.009)
3. Estrategia mundial para acelerar la eliminación del cáncer del cuello uterino como problema de salud pública [Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2022. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/336583/9789240014107-eng.pdf?sequence=1>
4. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological

- agents. *Lancet Oncol.* 2009 Apr; 10(4): 321-2. [10.1016/s1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70096-8)
5. Meisal R, Rounge TB, Christiansen IK, Eieland AK, Worren MM, Molden TF, et al. VPH Genotyping of Modified General Primer-Amplicons Is More Analytically Sensitive and Specific by Sequencing than by Hybridization. *PLoS One.* 2017 Jan 3;12(1) [10.1371/journal.pone.0169074](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169074).
 6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May; 71(3): [209-49 10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660).
 7. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. WHO 2022. Estimated age-standardized cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2022. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home> (Acceso febrero de 2024).
 8. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. International VPH screening working group. Efficacy of VPH-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916): 524-32. [10.1016/S0140-6736\(13\)62218-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7)
 9. Bruni L, Serrano B, Roura E, Alemany L, Cowan M, Herrero R, et al Cervical cancer screening programmes and age-specific coverage estimates for 202 countries and territories worldwide: a review and synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2022 Aug; 10(8). [10.1016/S2214-109X\(22\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00241-8)
 10. Ramírez AT, Valls J, Baena A, Rojas FD, Villagra V, Herrero R; ESTAMPA Study Group. Performance of cervical cytology and HPV testing for primary cervical cancer screening in Latin America: an analysis within the ESTAMPA study. *Lancet Reg Health Am.* 2023 Sep 20; 26: 100593. [10.1016/j.lana.2023.100593](https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100593)
 11. Salazar-Fajardo Lida Janneth, Benavides-Delgado Mónica Rocío Boogaard Sabine, Marín Yolanda. Estrategias Latinoamericanas para la Vacunación contra el Virus Del Papiloma Humano - Una Revisión Temática. *Hacia promoc. Salud.* 2017 Dec; 22(2): [129-143. 10.17151/hpsal.2017.22.2.10](https://doi.org/10.17151/hpsal.2017.22.2.10)
 12. Bobadilla ML, Zorrilla ME, Villagra V, Olmedo G, Roscher G, Franco F et al. Detección molecular del virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico en muestras cervicales. Laboratorio Central de Salud Pública: Primeros Resultados. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2015 Apr; 13(1): 17-23. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013\(01\)17-023](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2015.013(01)17-023)
 13. Bobadilla ML, Villagra V, Ortiz V, Deluca G, de Paula VS. High prevalence and co-infection of high-risk Human Papillomavirus genotypes among unvaccinated young women from Paraguay. *PLoS One.* 2023 Apr 6;18(4). [10.1371/journal.pone.0283542](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283542)
 14. Ejegod DM, Rebolj M, Bonde J. Comparison of analytical and clinical performance of CLART VPH2 genotyping assay to Linear Array and Hybrid Capture 2: a split-sample study. *BMC Cancer.* 2015 Apr 2; 15:216. [10.1186/s12885-015-1223-z](https://doi.org/10.1186/s12885-015-1223-z)
 15. Smelov V, Elfstrom KM, Johansson AL, Eklund C, Naucler P, et al Long-term HPV type-specific risks of high-grade cervical intraepithelial lesions: a 14-year follow-up of a randomized primary HPV screening trial. *Int J Cancer* 2015 Mar 1;136 (5):1171-80. [10.1002/ijc.29085](https://doi.org/10.1002/ijc.29085)
 16. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789-99. [10.1086/657321](https://doi.org/10.1086/657321)
 17. Correa RM, Baena A, Valls J, Colucci MC, Mendoza L, Rol M, et al. ESTAMPA Study Group. Distribution of human papillomavirus genotypes by severity of cervical lesions in HPV screened positive women from the ESTAMPA study in Latin America. *PLoS One.* 2022 Jul 29;17(7): e0272205. [10.1371/journal.pone.0272205](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272205)
 18. Cohen CM, Wentzensen N, Castle PE, Schiffman M, Zuna R, Arend RC, et al Racial and Ethnic Disparities in Cervical Cancer Incidence, Survival, and Mortality by Histologic Subtype. *J Clin Oncol.* 2023 Feb 10;41(5):1059-1068. [10.1200/JCO.22.01424](https://doi.org/10.1200/JCO.22.01424)
 19. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al; Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human

- papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1048-56.
[10.1016/S1470-2045\(10\)70230-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70230-8)
20. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.
[10.1016/S0140-6736\(05\)67069-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67069-9)
 21. Bobadilla ML, Villagra V, Zorrilla ME, Olmedo G, Riveros MC, Franco F, et al. Detección y tipificación del Virus Papiloma Humano en el marco del tamizaje virológico para la detección de lesiones del cuello uterino en Asunción, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2019; 17(1): 6-15.
[https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2019.017\(01\)06-015](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2019.017(01)06-015)
 22. Villagra-Carrón V, Bobadilla ML, Olmedo GB, Pratt-Santacruz P, Ortiz Rocio V, Lopez-Ibarra G, et al. Distribución de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico y otras infecciones de transmisión sexual en mujeres paraguayas con y sin virus de la inmunodeficiencia humana. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2022; 20(3): 134-141.
<http://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.03.134>
 23. Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *J Med Virol.* 2011 Aug; 83(8): 1351-7.
[10.1002/jmv.22112](https://doi.org/10.1002/jmv.22112)
 24. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Mar 2; 103(5): 368-83.
[10.1093/jnci/djq562](https://doi.org/10.1093/jnci/djq562)
 25. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. SBN 978-99925-11-05-3. Manual nacional de normas y procedimientos para la prevención y el control del cáncer del tracto genital inferior femenino Disponible en: <https://isbn.bibliotecanacional.gov.py/catalogo.php?mode=detalle&nt=14258>
 26. De Thurah L, Bonde J, Lam JUH, Rebolj M. Concordant testing results between various human papillomavirus assays in primary cervical cancer screening: systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Jan;24(1):29-36.
[10.1016/j.cmi.2017.05.020](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.05.020)
 27. Bonde J, Rebolj M, Ejegod DM, Preisler S, Lyng E, Rygaard C. HPV prevalence and genotype distribution in a population-based split-sample study of well-screened women using CLART HPV2 human papillomavirus genotype microarray system. *BMC Infect Dis.* 2014 Jul 26; 14: 413.
[10.1186/1471-2334-14-413](https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-413)
 28. Stoler MH, Wright TC Jr, Parvu V, Vaughan L, Yanson K, Eckert K, et al. The Oncoclarity Human Papillomavirus Trial: Design, methods, and baseline results. *Gynecol Oncol.* 2018 Jun; 149 (3): 498-505.
[10.1016/j.ygyno.2018.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.04.007)
 29. Arrossi S, Paolino M, Laudi R, Thouyaret L. Changing the paradigm of cervical cancer prevention through introduction of VPH-testing: evaluation of the implementation process of the Jujuy Demonstration Project in Argentina. *Ecancermedicalscience.* 2021 Mar 4; 15:1199.
[10.3332/ecancer.2021.1199](https://doi.org/10.3332/ecancer.2021.1199)
 30. Del Pino M, Alonso I, Rodriguez-Trujillo A, Bernal S, Geraets D, Guimerà N et al. Comparison of the analytical and clinical performance of five tests for the detection of human papillomavirus genital infection. *J Virol Methods.* 2017 Oct; 248: 238-243. [10.1016/j.jviromet.2017.07.009](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.07.009)
 31. Perkins RB, Guido RS, Castle PE, Chelmow D, Einstein MH, Garcia F, et al. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines Committee. 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines for Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2020 Apr;24(2): 102-131.
[10.1097/LGT.0000000000000525](https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000525)
 32. Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020 May; 65:98-108.
[10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008](https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008)
 33. Mongelos P, Mendoza LP, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in

- cervical samples from Paraguayan indigenous. *Int J Infect Dis.* 2015 Oct; 39: 44-9. [10.1016/j.ijid.2015.08.007](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.007)
34. Rebolj M, Preisler S, Ejegod DM, Rygaard C, Lynge E, Bonde J. Disagreement between human papillomavirus assays: an unexpected challenge for the choice of an assay in primary cervical screening. *PLoS One.* 2014 Jan 20; 9(1). [10.1371/journal.pone.0086835](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086835)
35. Lim YK, Choi JH, Park S, Kweon OJ, Park AJ. Comparison of Three Different Commercial Kits for the Human Papilloma Virus Genotyping. *J Clin Lab Anal.* 2016 nov; 30(6): 1110-1115. [10.1002/jcla.21989](https://doi.org/10.1002/jcla.21989)
36. Ki EY, Lee YK, Lee A, Park JS. Comparison of the PANArray HPV Genotyping Chip Test with the Cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 Tests for Detection of HPV in ASCUS Women. *Yonsei Med J.* 2018 Jul; 59(5): 662-668. [10.3349/ymj.2018.59.5.662](https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.5.662)
37. Sias C, Garbuglia AR, Piselli P, Cimaglia C, Lapa D, Del Nonno F, et al Comparison of the Abbott RealTime High Risk HPV with Genomica HPV Clinical Array for the detection of human papillomavirus DNA. *APMIS.* 2013 Nov; 121 (11): 1054-639 (5) : 662-668. [10.1111/apm.12054](https://doi.org/10.1111/apm.12054)
38. Rebolj M, Bonde J, Preisler S, Ejegod D, Rygaard C, Lynge E. Human Papillomavirus Assays and Cytology in Primary Cervical Screening of Women Aged 30 Years and Above. *PLoS One.* 2016 Jan 20; 11(1).
39. Nygård M, Hansen BT, Kjaer SK, Hortlund M, Tryggvadóttir L, Munk et al papillomavirus genotype-specific risks for cervical intraepithelial lesions. *Hum Vaccin Immunother.* 2021 Apr 3; 17(4): 972-981. [10.1080/21645515.2020.1814097](https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1814097)
40. Kamolratanakul S, Pitisuttithum P. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. *Vaccines (Basel).* 2021 Nov 30; 9(12): 1413. [10.3390/vaccines9121413](https://doi.org/10.3390/vaccines9121413)