

## Aplicación de un método de reacción en cadena de la polimerasa anidada-múltiple para la tipificación de papilomavirus humano

### Application of a nested multiplex polymerase chain reaction method in the typing of human papillomavirus

Leoncio Arcos Soliz,<sup>I</sup> Yudira Soto Brito,<sup>II</sup> Gabriel Morey León,<sup>I,III</sup> Eduardo Jurado Cobeña<sup>I,IV</sup>

<sup>I</sup> Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez". Guayaquil, Ecuador.

<sup>II</sup> Departamento de Virología. Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

<sup>IV</sup> Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guayaquil, Ecuador.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** existen numerosas técnicas tanto comerciales o caseras, para la detección de infecciones por papilomavirus humano. Para detectar infecciones múltiples se requieren técnicas robustas con alta sensibilidad y especificidad.

**Objetivos:** implementar un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa anidada-múltiple para la detección y tipificación de papilomavirus humano en muestras anogenitales de hombres ecuatorianos.

**Métodos:** Se estudiaron 29 muestras de cepillado de la región anogenital de hombres ecuatorianos, residentes en dos regiones del país (25 muestras de pene y 4 muestras de la mucosa anal de pacientes con condilomas anales). El protocolo se aplicó utilizando cebadores dirigidos a las regiones conservadas de los genes virales E6/E7, para una primera reacción en cadena de la polimerasa. En la segunda reacción en cadena de la polimerasa, anidada-múltiple, se usaron cebadores específicos agrupados en 3 mezclas de 4 genotipos, lo que permitió la discriminación de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico, por la talla del producto amplificado.

**Resultados:** se obtuvo el 59 % de muestras positivas (17/29) con predominio de los siguientes genotipos: papilomavirus humano 43 (31 %), 16 (28 %), 6/11 (24 %), 42 (24 %), 58 (14 %) y 52 (10 %). Se observó un mayor porcentaje de muestras con infección por un solo genotipo (41 %; 7/17), seguido de infección múltiple con más de 3 genotipos (29 %; 5/17), con 2 genotipos (18 %; 3/17) y con 3 genotipos (12 %; 2/17).

**Conclusiones:** el protocolo aplicado es específico para los genotipos de papilomavirus humano analizados. El uso de cocteles de cebadores con varios genotipos permite la discriminación de estos, lo cual demuestra que la técnica aplicada es útil para su uso en el diagnóstico de 12 genotipos diferentes de papilomavirus humano.

**Palabras clave:** virus papiloma humano; E6/E7; RCP anidada-múltiple; hombres; Ecuador.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** there are a large number of techniques, both commercial and in house, for detection of human papillomavirus infection. To detect multiple infections, robust techniques are required which provide high sensitivity and specificity.

**Objectives:** implement a nested multiplex polymerase chain reaction protocol for detection and typing of human papillomavirus in anogenital samples from Ecuadorian men.

**Methods:** a study was conducted of 29 samples obtained by anogenital brushing performed Ecuadorian men from two regions in the country (25 samples from the penis and 4 from the anal mucosa of patients with anal condylomata). The protocol was applied using primers aimed at conserved regions of viral genes E6/E7 for an initial polymerase chain reaction. For the second polymerase chain reaction, nested and multiplex, specific primers were grouped in three cocktails of four genotypes, making it possible to discriminate high from low oncogenic risk genotypes, based on the size of the amplified product.

**Results:** 59 % of the samples were positive (17/29) with a predominance of the following genotypes: human papillomavirus 43 (31 %), 16 (28 %), 6/11 (24 %), 42 (24 %), 58 (14 %) and 52 (10 %). A higher percentage of samples were found to be infected by a single genotype (41 %; 7/17), followed by multiple infection by more than three genotypes (29 %; 5/17), two genotypes (18 %; 3/17) and three genotypes (12 %; 2/17).

**Conclusions:** the protocol applied is specific for the human papillomaviruses analyzed. Use of cocktails of primers with several genotypes makes it possible to discriminate the latter, demonstrating that the technique applied is useful for diagnosing 12 different human papillomavirus genotypes.

**Keywords:** human papillomavirus; E6/E7; nested multiplex PCR; men; Ecuador.

## INTRODUCCIÓN

La infección por papilomavirus humanos (PVH) constituye la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente a escala mundial y es la condición necesaria para el desarrollo de cáncer cervicouterino.<sup>1-3</sup> Estos virus infectan tanto a mujeres como a hombres; en estos últimos, asociados principalmente a condilomas anogenitales y a neoplasias intraepiteliales de pene y de ano.<sup>4,5</sup> Se han descrito más de 120 genotipos de PVH con tropismo para epitelios escamosos estratificados. Los PVH transmitidos por vía sexual son alrededor de 40, agrupados en PVH de bajo riesgo oncogénico (PVH-BR) y de alto riesgo oncogénico (PVH-AR). Los genotipos de PVH-BR 6 y 11 causan comúnmente condilomas anogenitales en hombres y mujeres. Los genotipos de PVH-AR tienen mayor incidencia en los procesos neoplásicos y de ellos, el PVH 16 es el más frecuente a escala global.<sup>6</sup> Durante varios años, la infección por PVH en hombres se consideró con escasa relevancia médica. En algunos estudios se ha asociado la infección por PVH, en hombres, con: condilomas genitales, neoplasia intraepitelial anal (NIA), cáncer de pene, cáncer anal, cáncer oro-faríngeo, cáncer de próstata y uretra.<sup>7-9</sup> Las asociaciones más estudiadas y comprobadas son con el cáncer de pene, de laringe y con el cáncer anal.<sup>10-12</sup>

El método más utilizado para la detección de PVH, tanto en hombres como en mujeres, es la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y sus variantes. Mediante la RCP puede detectarse un solo genotipo de PVH o pueden detectarse varios tipos simultáneamente, ya sea utilizando una mezcla de cebadores específicos o empleando cebadores degenerados o consenso. Luego de la amplificación, los genotipos pueden identificarse mediante secuenciación nucleotídica, análisis con enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas o por una RCP adicional con cebadores específicos.<sup>13</sup>

En Ecuador, no existen investigaciones que aporten datos sobre la infección por PVH en hombres. Solamente se reportan casos desde el punto de vista clínico, sin que se haya realizado el diagnóstico confirmatorio de la infección, mediante estudios moleculares.

El objetivo del presente trabajo fue implementar un protocolo de RCP anidada-múltiple para la detección y tipificación de genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico de PVH, como técnica para identificar los genotipos circulantes en muestras de hombres ecuatorianos.

## MÉTODOS

### MUESTRAS CLÍNICAS

Los especímenes clínicos consistieron en 29 muestras anogenitales de hombres: 25 muestras de células epiteliales del pene y 4 muestras de células del canal anal de pacientes con condilomas anales. La toma de la muestra se realizó utilizando un cepillo de cerdas semirrígidas que se emplea comúnmente para efectuar cepillado del canal endocervical. Previamente se roció toda el área anatómica del pene con solución salina, el cepillo se rotó suavemente, 360° para obtener exfoliación epitelial. Se inició en el glande hasta la zona de transición mucosa-piel del tercio anterior del cuerpo del pene. El cepillo se colocó en el interior del frasco para su

conservación y almacenamiento en el medio adecuado (Sure Path. Burlington, NC 27215 USA). En la región anal se realizó la toma de la muestra con el mismo procedimiento, pero con un hisopo de algodón. La toma tuvo lugar en posición mahometana con maniobra de Valsalva para exponer el epitelio y evitar una eventual erosión. En el área del canal anal, no rociada con solución salina, se exfolió el epitelio con cepillo a 1,5 cm de profundidad con 3 giros inversos de 360°. Se completó el procedimiento como está descrito anteriormente. Las muestras se codificaron y se almacenaron manteniendo la cadena de frío a -20 °C hasta su procesamiento.

#### OBTENCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Para la extracción del ADN se utilizó el estuche comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen, Biosciences, CA. EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuidadosamente, el material exfoliado, se resuspendió en 350 µL de solución salina tamponada (PBS), mediante rotación adhesiva de los hisopos a la pared del tubo y se adicionó 1 µL de ARNasa A. De inmediato, se realizaron todos los pasos recomendados. El ADN extraído, se eluyó en 100 µL de agua ultra pura y se conservó a -20 °C.

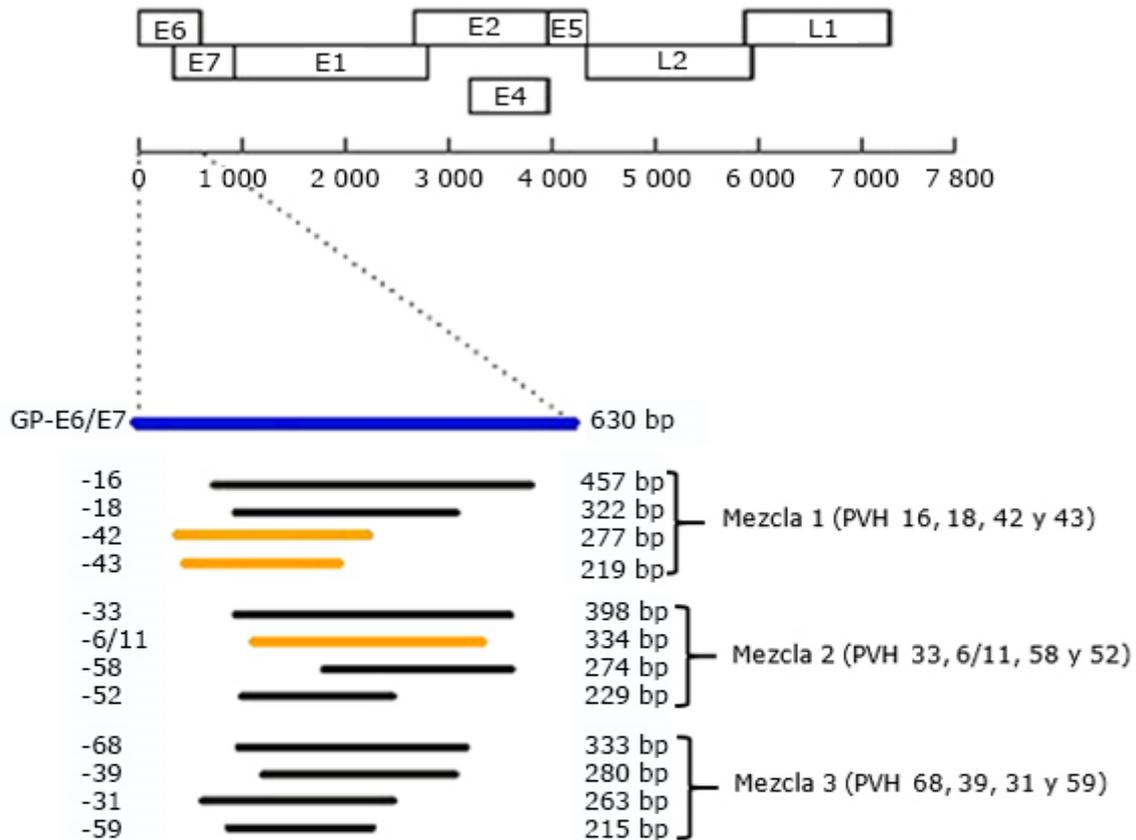
#### CEBADORES EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE PVH

Se realizó la detección de los PVH-BR 6/11, 42 y 43; y de alto riesgo oncogénico PVH-AR 16, 18, 31, 33, 39, 52, 58, 59 y 68. Para ello se utilizaron, en una primera RCP, los cebadores sintéticos universales GPE6/E7: GP-E6-3F (sentido positivo); GP-E7-5B y GP-E7-6B (sentido negativo) dirigidos a las regiones conservadas de los genes virales E6/E7 (Integrated DNA Technologies, IA EE. UU.). En esta primera RCP se amplificó un fragmento de 630 pares de base (pb). Para las RCP anidadas-múltiples se emplearon cebadores específicos de cada genotipo agrupados en 3 mezclas de 4 genotipos y los productos amplificados estaban en el rango entre 457 y 219 pb (Fig. 1). Las secuencias específicas de todos los cebadores y el protocolo de la RCP fueron publicadas previamente por *Sotlar* y otros,<sup>14</sup> en el 2004.

#### REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 1X de la mezcla de reacción 2X (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EE. UU.); 250 µM de dNTPs (Promega, Madison, WI, EE. UU.); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 U de ADN polimerasa termoestable (AmpliTaq DNA Polymerase; Perkin-Elmer Cetus) y 10 µM de cada cebador.<sup>14</sup> Se utilizaron 5 µL de ADN de las muestras clínicas en la primera RCP y 1 µL del producto de la primera reacción como blanco para las RCP anidadas-múltiples.

Las condiciones de amplificación para la primera reacción con los cebadores GPE6E7 fueron: 1 ciclo a 94 °C 4 min, seguido de 40 ciclos de amplificación a 94 °C 1 min, 40 °C 1 min y 72 °C 2 min; 1 ciclo final a 72 °C 10 min y 4 °C para la conservación.



*Fuente:* Modificado a partir del artículo de Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3176-84.

**Fig. 1.** Diagrama para el diseño de los cebadores. Se observa la talla y posición del producto de la primera RCP con los cebadores GPE6E7. También se observa la posición de los productos de amplificación obtenidos con cebadores específicos mediante la RCP anidada-múltiple en relación al genoma de PVH 16 (número de acceso AB889493). Los cebadores para genotipos específicos de PVH están organizados en 3 mezclas de 4 genotipos. Obsérvese la diferencia de tamaños en pares de base (pb) de los productos a obtenerse tanto para los genotipos de bajo riesgo 06/11, 42 y 43 como para los genotipos de alto riesgo, perfectamente diferenciables.

Las RCP anidadas-múltiples con mezclas de cebadores específicos de cada genotipo de PVH,<sup>14</sup> se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94 °C 30 s y 72 °C 45 s, 1 ciclo final a 72 °C por 4 min y 4 °C para su conservación. Se chequearon 10 µL de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con colorante para ADN (SYBR Safe DNA gel staining; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para su visualización se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (Spectrolin<sup>®</sup>; Bi-O-Vision<sup>TM</sup>, Alemania).

## CONTROLES POSITIVOS

Se utilizaron como controles positivos, productos amplificados de muestras endocervicales previamente caracterizadas mediante metodología de hibridación *in situ* para tipificación de PVH de alto y bajo riesgo oncogénico, gentilmente donadas por la Universidad Estatal de Cuenca y Hospital SOLCA-Portoviejo, Ecuador.

## SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA

Los productos amplificados que resultaron positivos mediante las RCP anidadas-múltiples, se purificaron con el sistema Wizard®; SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Dichos productos se secuenciaron en la empresa MACROGEN (Seoul, Korea). Para ello se emplearon los mismos cebadores específicos de los genotipos para los cuales cada muestra había resultado positiva. En las muestras positivas para más de un genotipo se utilizaron los cebadores específicos para cada genotipo de PVH, que se emplearon en las reacciones de amplificación, utilizando la tecnología BigDye®; Terminator versión 3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con la herramienta bioinformática Bioedit<sup>15</sup> y el programa de análisis filogenético molecular evolutivo (MEGA) versión 6.01.<sup>16</sup> Dichas secuencias se compararon con varias de las secuencias de referencia internacional, disponibles en la base de genes GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>) y se alinearon mediante BLAST (del inglés Basic Local Alignment Search Tool) para definir el genotipo de PVH presente en cada muestra clínica.

## ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La distancia genética entre las secuencias de las muestras ecuatorianas y las de referencia se calculó con el programa MEGA 6 versión 6.01.<sup>16</sup> El árbol filogenético de las secuencias obtenidas a partir de muestras que presentaron un solo genotipo (7 muestras) se construyó empleando este mismo programa, mediante el modelo Kimura-2-parámetros y el método estadístico Neighbor-Joining con un análisis de remuestreo (bootstrap) de 10 000 réplicas. En todos los casos positivos mediante RCP anidada-múltiple, la secuenciación nucleotídica se utilizó para confirmar los resultados obtenidos mediante el protocolo de RCP aplicado.

## Aspectos éticos

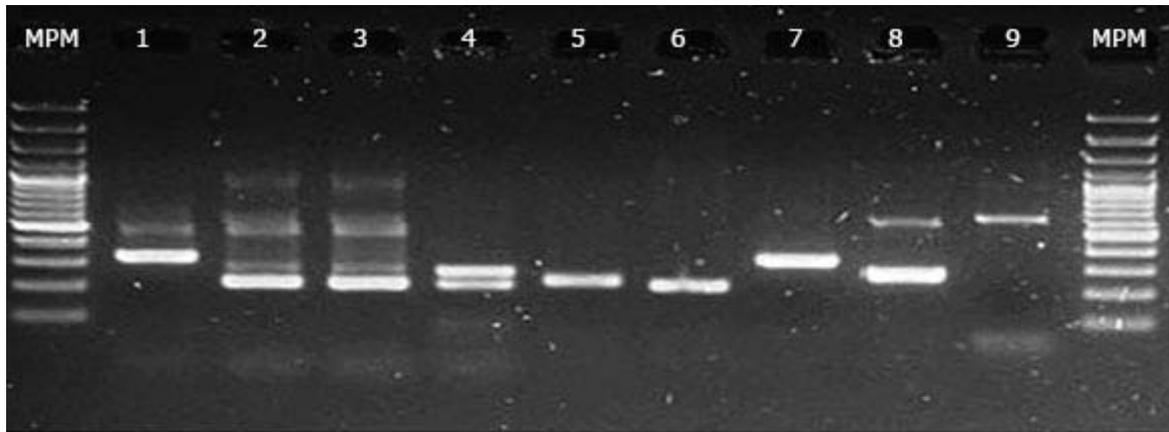
El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital "Luis Vernaza" de Guayaquil. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los sujetos para participar en la investigación. Se comunicó que la investigación se realizaría teniendo en cuenta los principios éticos de la Declaración de Helsinki sobre investigación clínica en humanos. Se les informó las ventajas de participar en el estudio y que podían retirarse del mismo en el momento que lo desearan.

## RESULTADOS

Se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se aplicó la RCP con cebadores universales de la región GPE6/E7, así como con la aplicación de las RCP anidada-múltiples con cebadores específicos para cada genotipo. Se logró amplificar

---

fragmentos de ADN viral para los genotipos específicos de PVH de alto y bajo riesgo oncogénico, a la talla esperada, cuando se aplicó la metodología a controles positivos a partir de muestras previamente tipificadas mediante el método de hibridación *in situ* (Fig. 2).



MPM: marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder); línea 1: muestra positiva a genotipos 16 (457 pb) y 68 (333 pb); líneas 2 y 3: muestras positivas a genotipos 16 (457 pb), 58 (274 pb) y 43 (219 pb); línea 4: muestra positiva a genotipos 58 (274 pb) y 43 (219 pb); línea 5: muestra positiva a genotipo 31 (263 pb); línea 6: muestra positiva a genotipo 52 (229 pb); línea 7: muestra positiva a genotipo 6/11 (334 pb); línea 8: muestra positiva a genotipo 42 (277 pb); línea 9: producto amplificado con los cebadores universales GP-E6-3F, GP-E7-5B y GP-E7-6B en la primera RCP (630 pb).

**Fig. 2.** Resultados de las reacciones de amplificación para los controles positivos.

La tabla muestra la frecuencia de muestras positivas, mediante las RCP anidadas-múltiples, a partir del ADN extraído a las 29 muestras estudiadas. Se obtuvo un 59 % de muestras positivas (17/29) con mayor frecuencia de los genotipos 43, 16, 6/11, 42, 58 y 52. Los genotipos de bajo riesgo oncogénico se presentaron con mayores porcentajes, con excepción del genotipo 16. El genotipo de PVH-AR 59 no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. En todas las muestras se obtuvo amplificación durante la primera RCP. Además, las RCP anidadas-múltiples funcionaron adecuadamente para todos los genotipos analizados.

De las 17 muestras positivas, 10 (59 %) tuvieron infección con más de un genotipo de PVH y 5 (50 %) de ellas tenían infecciones múltiples con más de 3 genotipos. Las infecciones múltiples predominaron en las muestras de la región anal, donde se observó infección hasta con 7 genotipos diferentes, tanto de alto como de bajo riesgo oncogénico. Las infecciones con un solo genotipo se detectaron en el 41 % de los casos positivos (7/17), las infecciones dobles en el 18 % (3/17) y las infecciones con 3 genotipos en el 12 % (2/17) de los casos.

Mediante la secuenciación nucleotídica se obtuvo secuencias de PVH a partir de muestras anogenitales de hombres ecuatorianos (Fig. 3). Esta metodología se empleó como referencia para corroborar los resultados obtenidos en la tipificación mediante la RCP anidada-múltiple implementada.

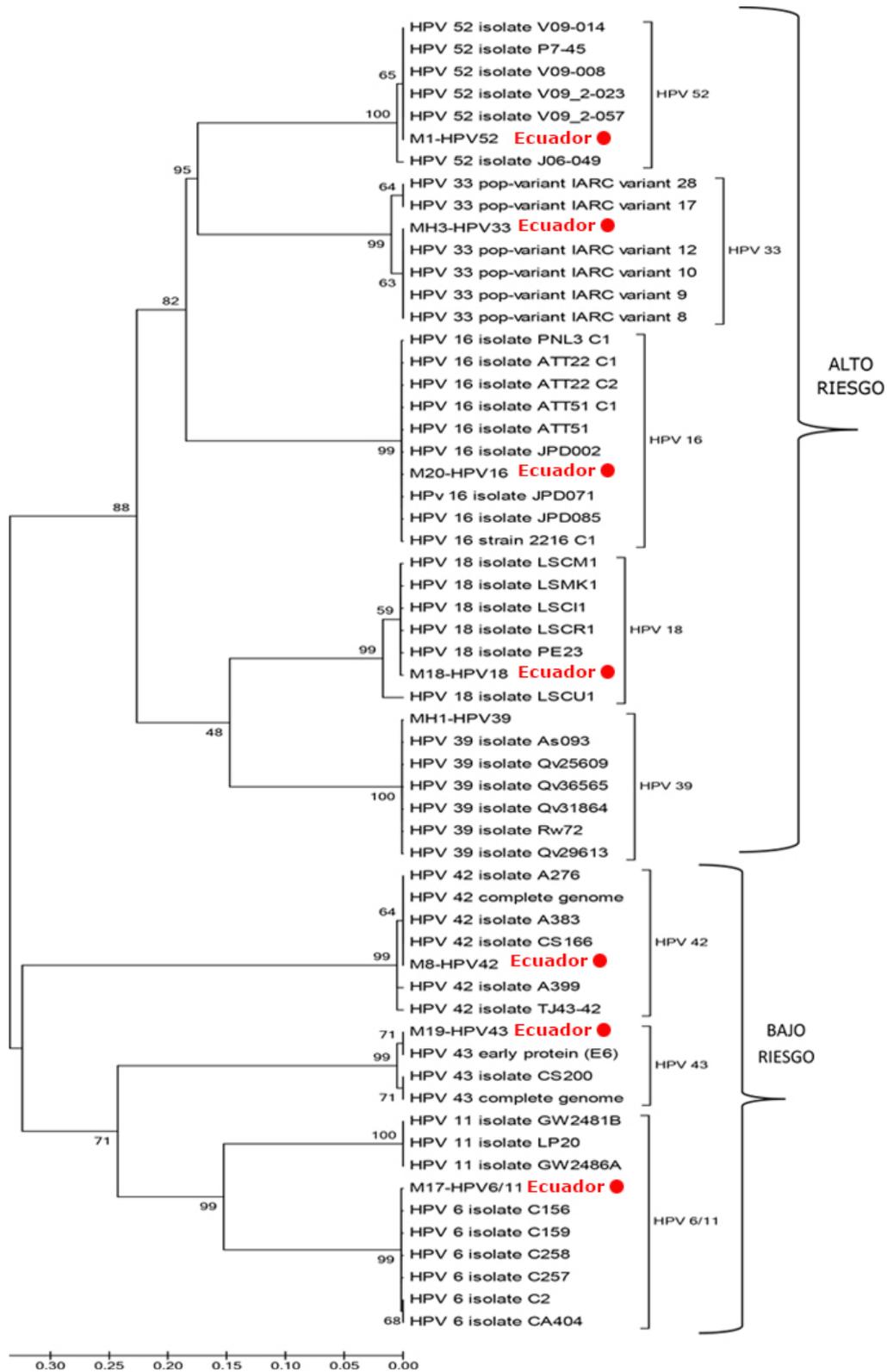
**Tabla.** Frecuencia de positividad a PVH mediante RCP anidada-múltiple en muestras anogenitales de hombres ecuatorianos

Genotipos de PVH	Casos positivos	% de positividad
43	9	31
16	8	28
6/11	7	24
42	7	24
58	4	14
52	3	10
68	2	7
18	2	7
31	1	3
33	1	3
39	1	3
59	0	0

PVH: papilomavirus humano; RCP: reacción en cadena de la polimerasa; VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de las secuencias de PVH a partir de las muestras clínicas coincidieron con los resultados obtenidos por la RCP anidada-múltiple implementada, en el 100 % de los casos. Esta metodología permitió identificar los genotipos presentes en las muestras clínicas, incluso en aquellas con coinfecciones, al utilizar cebadores específicos para cada tipo de PVH.

El árbol filogenético de las muestras que presentaron un solo genotipo de PVH se ilustra en la [figura 3](#) y se observan dos grupos filogenéticos marcadamente diferenciados para los genotipos de alto riesgo (16, 18, 33, 39, 52) y de bajo riesgo oncogénico (6/11, 42, 43) ([Fig. 3](#)).



En las secuencias de muestras ecuatorianas aparece la palabra "Ecuador" en letras rojas y se identifican por una circunferencia del mismo color; las secuencias de referencia aparecen completamente en letras negras.

**Fig. 3.** Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias nucleotídicas de la región E6/E7 de PVH obtenidas de muestras clínicas positivas para los genotipos PVH 6/11, 16, 18, 33, 42, 43 y 52.

## DISCUSIÓN

Actualmente, la evidencia de infección por PVH, es la detección del ADN viral. Mediante la RCP se puede detectar un solo genotipo de PVH utilizando cebadores que se unan a secuencias específicas del genoma viral, o pueden detectarse varios tipos simultáneamente, ya sea utilizando una mezcla de cebadores específicos o empleando cebadores degenerados o consenso. Los protocolos de RCP que se utilizan para la detección de PVH generalmente emplean cebadores degenerados o consenso tales como: MY09/11, PGMY09/11, GP5+/GP6+ y SPF,<sup>17</sup> los cuales permiten la amplificación de un gran número de genotipos en una misma reacción de amplificación. Estos cebadores amplifican regiones conservadas del genoma de PVH dentro del gen L1.<sup>18</sup> Luego de la amplificación, los genotipos pueden identificarse mediante secuenciación nucleotídica, análisis con enzimas de restricción,<sup>19</sup> hibridación directa o reversa con sondas específicas o por una RCP anidada con cebadores específicos o con mezclas de cebadores<sup>13</sup>. La región L1 del genoma viral es la diana más frecuente para las técnicas de amplificación, aunque también se usan otros genes virales menos conservados como E6, E7 y LCR que se emplean más comúnmente en ensayo de RCP en tiempo real.<sup>20,21</sup>

*Sotlar* y otros en 2004 normalizaron una RCP anidada-múltiple para tipificar 14 genotipos de PVH de alto riesgo oncogénico y 4 genotipos de bajo riesgo, en muestras cervicales. Estos investigadores diseñaron una primera RCP con cebadores universales o consenso a partir de secuencias específicas de los oncogenes E6/E7 del genoma de PVH que codifican proteínas tempranas con función transformante. En la segunda reacción de amplificación utilizaron cebadores específicos para los genotipos de PVH-BR 6/11, 42 y 43; y de alto riesgo oncogénico PVH-AR 16, 18, 31, 33, 39, 52, 58, 59 y 68.<sup>14</sup>

*Nishiwaki* y otros<sup>22</sup> en 2008 publicaron un protocolo para la tipificación de PVH en un solo ensayo, mediante RCP múltiple para 16 genotipos virales. Por otra parte, *Dictor* y *Warenholt*<sup>23</sup> en 2011 combinaron eficientemente la RCP múltiple dirigida a los genes E6/E7 con un ensayo de electroforesis capilar, para la detección de 19 genotipos PVH-AR y 2 genotipos de PVH-BR.

En esta investigación se emplearon los cebadores diseñados por *Sotlar* y otros en 2004 para identificar 12 genotipos de PVH, con el fin de detectar infección por PVH en muestras anogenitales de hombres ecuatorianos. Al utilizar la estrategia de *Sotlar* y otros, se logró la amplificación de PVH para 11 de los 12 genotipos que incluye el ensayo, ya fuera en infecciones simples o múltiples. El protocolo aplicado con el uso de cocteles de cebadores que contenían varios genotipos, permitió la discriminación de estos en los controles y las muestras clínicas.

Cuando se investigaron las muestras clínicas se observó que los genotipos de bajo riesgo oncogénico se presentaron con mayores porcentajes, predominando el genotipo 43; con excepción del genotipo 16 que fue el segundo más frecuente y es el genotipo de alto riesgo oncogénico más comúnmente identificado a escala global tanto en mujeres,<sup>24,25</sup> como en hombres.<sup>12,26,27</sup>

En un estudio realizado por *Giuliano* y otros<sup>28</sup> a 1 160 hombres de Brasil, Estados Unidos y México, para detectar infección anogenital por PVH se identificó la presencia de los genotipos de PVH-AR 16, 51, 59 y de bajo riesgo oncogénico PVH 6, 62 y 84.

Por otra parte, en un estudio realizado por *Rositch* y otros<sup>29</sup> a 2 702 hombres kenyanos seronegativos a VIH, se obtuvo 51 % de positividad a algún genotipo de PVH, 29 % de casos con infecciones múltiples y PVH 16 como el genotipo más frecuente.

En otra investigación realizada por *Albero* y otros<sup>5</sup> en que se estudiaron 4 072 muestras de hombres sanos se detectaron con mayor frecuencia los genotipos de PVH-AR 16 y 51 y los de bajo riesgo PVH 62 y 84.

Los resultados de la presente investigación concuerdan con los estudios de *Giuliano* y otros,<sup>28</sup> *Rositch* y otros,<sup>29</sup> y con los estudios publicados por *Albero* y otros,<sup>5</sup> pues en ellos se detectaron genotipos similares y con frecuencias muy parecidas. Sin embargo, en ninguna de estas investigaciones se identificó al genotipo de PVH 43, mucho menos como el más frecuente, como es el caso del presente estudio.

Estudios realizados por *Soto* y otros en muestras anogenitales de hombres cubanos seropositivos al VIH muestran la presencia de varios genotipos de PVH en la localización anal y perianal. Sin embargo, los genotipos más frecuentes de PVH de bajo riesgo oncogénico fueron PVH 6 y 11, además de PVH 16 como el más frecuente dentro de los PVH-AR.<sup>30,31</sup>

En esta investigación los resultados obtenidos por la RCP anidada-múltiple implementada coincidieron con los resultados obtenidos mediante el análisis de las secuencias de PVH a partir de las muestras clínicas, en todos los casos. Esta metodología permitió identificar los genotipos presentes en las muestras clínicas, incluso en aquellas con coinfecciones, al utilizar cebadores específicos para cada tipo de PVH, lo cual demuestra que la técnica es útil para el diagnóstico de PVH en hombres.

Aunque la metodología empleada resultó útil, el pequeño número de casos limita la posibilidad de identificar las frecuencias reales de los diferentes genotipos de PVH en la población de hombres ecuatorianos. Sin embargo, el objetivo del presente estudio fue lograr implementar la metodología de RCP anidada-múltiple para la identificación de varios genotipos de PVH en muestras anogenitales masculinas. La metodología fue implementada correctamente y se puede concluir que el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública "Dr. Leopoldo Izquieta Pérez" Guayaquil-Ecuador cuenta en estos momentos con una metodología que permite la detección de infecciones anogenitales por PVH en hombres. Esta metodología ya fue probada en muestras cervicouterinas por los autores del protocolo original y su empleo pudiera extenderse para este propósito en hombres ecuatorianos. De esta forma se pudiera estudiar la frecuencia de infección por PVH en hombres ecuatorianos, pues no se cuenta con datos publicados sobre este tema.

## Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.

2. Arbyn M, Simoens C, Van Damme P, Scharpantgen A, Meijer CJ, Beutels P. Introduction of human papillomavirus vaccination in Belgium, Luxembourg and the Netherlands. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;70(4):224-32.
3. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Forman D, Lacey CJ, Soerjomataram I, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 2012;30(Suppl 5):F12-23.
4. Driak D, Sehnal B. Significance of human papillomavirus infections. *Cas Lek Cesk.* 2013;152(1):15-9.
5. Albero G, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Fulp W, Papenfuss MR, Nyitray AG, et al. Male circumcision and prevalence of genital human papillomavirus infection in men: a multinational study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:18.
6. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(3):792-800.
7. Martin-Ezquerria G, Fuste P, Larrazabal F, Lloveras B, Fernandez-Casado A, Belosillo B, et al. Incidence of human papillomavirus infection in male sexual partners of women diagnosed with CIN II-III. *Eur J Dermatol.* 2012;22(2):200-4.
8. Sudenga SL, Ingles DJ, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp WJ, Messina JL, et al. Genital Human Papillomavirus Infection Progression to External Genital Lesions: The HIM Study. *Eur Urol.* 2016;69(1):166-73.
9. Silva R, Leon D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sanchez R. Detection of human papilloma virus infection in men. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30(2):186-92.
10. Smith JS, Gilbert PA, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. *J Adolesc Health.* 2011;48(6):540-52.
11. Dona MG, Palamara G, Di Carlo A, Latini A, Vocaturo A, Benevolo M, et al. Prevalence, genotype diversity and determinants of anal HPV infection in HIV-uninfected men having sex with men. *J Clin Virol.* 2012;54(2):185-9.
12. Damay A, Fabre J, Costes V, Didelot JM, Didelot MN, Boulle N, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence and type distribution, and HPV-associated cytological abnormalities in anal specimens from men infected with HIV who have sex with men. *J Med Virol.* 2010;82(4):592-6.
13. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J.* 2012;9:262.
14. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3176-84.
15. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999;41:95-7.

16. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725-9.
17. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(4): 901-5.
18. Camargo M, Soto-De Leon S, Sanchez R, Munoz M, Vega E, Beltran M, et al. Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *J Virol Methods.* 2011; 178(1-2): 68-74.
19. Maver PJ, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ. Detection and typing of low-risk human papillomavirus genotypes HPV 6, HPV 11, HPV 42, HPV 43 and HPV 44 by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *J Virol Methods.* 2010; 169(1): 215-8.
20. Soto Y, Kourí V, Martínez PA, Correa C, Torres G, Goicolea A, et al. Standardization of a real-time based polymerase chain reaction system for the quantification of human papillomavirus of high oncogenic risk. *Vaccimonitor.* 2012; 21(1): 30-7.
21. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol.* 2009; 44(4): 302-7.
22. Nishiwaki M, Yamamoto T, Tone S, Murai T, Ohkawara T, Matsunami T, et al. Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(4): 1161-8.
23. Dictor M, Warenholt J. Single-tube multiplex PCR using type-specific E6/E7 primers and capillary electrophoresis genotypes 21 human papillomaviruses in neoplasia. *Infect Agent Cancer.* 2011; 6(1): 1.
24. Basu P, Mittal S, Bhaumik S, Mandal SS, Samaddar A, Ray C, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasias in a previously unscreened population -a pooled analysis from three studies. *Int J Cancer.* 2013; 132(7): 1693-9.
25. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011; 128(4): 927-35.
26. de Pokomandy A, Rouleau D, Ghattas G, Vezina S, Cote P, Macleod J, et al. Prevalence, clearance, and incidence of anal human papillomavirus infection in HIV-infected men: the HIPVIRG cohort study. *J Infect Dis.* 2009; 199(7): 965-73.
27. Machalek DA, Grulich AE, Jin F, Templeton DJ, Poynten IM. The epidemiology and natural history of anal human papillomavirus infection in men who have sex with men. *Sex Health.* 2012; 9(6): 527-37.

28. Giuliano AR, Lazcano-Ponce E, Villa LL, Flores R, Salmeron J, Lee JH, et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(8):2036-43.
29. Rositch AF, Poole C, Hudgens MG, Agot K, Nyagaya E, Moses S, et al. Multiple human papillomavirus infections and type competition in men. *J Infect Dis.* 2012;205(1):72-81.
30. Limia CM, Soto Y, García Y, Blanco O, Kourí V, López MV, et al. Human papillomavirus infection in anal intraepithelial lesions from HIV infected Cuban men. *Infect Agent Cancer.* 2017;12:5. doi: 10.1186/s13027-017-0118-9
31. Blanco OA, Soto Y, Blanco B, Acosta S, Capó de Paz V, Toledo ME. Detección y tipificación de papilomavirus humano en lesiones condilomatosas anogenitales de hombres cubanos seropositivos al VIH-1. *Rev Biomed.* 2011;22(1):21-30.

Recibido: 10 de enero de 2017.

Aceptado: 24 de julio de 2017.

*Yudira Soto Brito.* Departamento de Virología. Laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6½, Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: [Yudira@ipk.sld.cu](mailto:Yudira@ipk.sld.cu)