



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
SISTEMA DE POSGRADO
ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

TEMA:

**“TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES CON
LESIONES CERVICALES DE ALTO GRADO Y CÁNCER DE CÉRVIX ATENDIDAS EN EL
ÁREA DE COLPOSCOPIA EN CONSULTA EXTERNA DEL ION SOLCA GUAYAQUIL.
PERIODO 2013-2014”**

Nancy Jannet Morocho Molina

Director: Salvador Encalada Orellana, MD

Guayaquil, Ecuador

2014-2015



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
SISTEMA DE POSGRADO
ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS DE LA SALUD

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la *Dra. Nancy Jannet Morocho Molina*, como requerimiento parcial para la obtención del Título de Especialista en *Ginecología Oncológica*.

Guayaquil, a los 21 días del mes de abril del 2015

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Salvador Encalada Orellana

DIRECTOR DEL PROGRAMA:

Dra. Glenda Ramos

REVISOR:

Dr. Xavier Landívar Varas



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
SISTEMA DE POSGRADO
ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS DE LA SALUD

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD:

YO, Nancy Jannet Morocho Molina

DECLARO QUE:

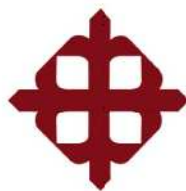
El Trabajo de Tesis **“TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES CON LESIONES CERVICALES DE ALTO GRADO Y CÁNCER DE CÉRVIX ATENDIDAS EN EL ÁREA DE COLPOSCOPIA EN CONSULTA EXTERNA DEL ION SOLCA GUAYAQUIL. PERIODO 2013-2014”** previa a la obtención del Título de Especialista, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el texto del trabajo, y cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del Trabajo de Tesis mencionado.

Guayaquil, a los 22 días del mes de abril del 2015

EL AUTOR:

Nancy Jannet Morocho Molina



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL
SISTEMA DE POSGRADO
ESCUELA DE GRADUADOS EN CIENCIAS DE LA SALUD

AUTORIZACIÓN:

YO, Nancy Jannet Morocho Molina

Autorizo a la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, la publicación en la biblioteca de la institución del trabajo de investigación de Especialización titulado: **“TIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN MUJERES CON LESIONES CERVICALES DE ALTO GRADO Y CÁNCER DE CÉRVIX ATENDIDAS EN EL ÁREA DE COLPOSCOPIA EN CONSULTA EXTERNA DEL ION SOLCA GUAYAQUIL. PERIODO 2013-2014”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y total autoría.

Guayaquil, a los 22 días del mes de abril del 2015

EL AUTOR:

Nancy Jannet Morocho Molina

AGRADECIMIENTOS

PRIMERO a Dios, gracias porque siempre me has sostenido en tus brazos y guías todos los días de mi vida.

Agradezco a mi esposo Henin porque ha sido el pilar fundamental para plasmar mi sueño de ser Ginecóloga Oncóloga en una bella realidad.

A mis hijos Luigi y Romina por comprender mis diarias ausencias y por ser mi más grande fortaleza.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Peter Chedraui, Dr. Salvador Encalada, MS.c César Bedoya y al personal del instituto de Biomedicina, INSPI y SOLCA por colaborar en este gran proyecto.

DEDICATORIA

Dedicado a todas las mujeres que libran una lucha diaria contra el Cáncer de Cérvix.

A los hombres para que concienticen que sólo en sus manos está el terminar, incluso eliminar el contagio del Virus del Papiloma Humano y otras enfermedades de transmisión sexual, que está matando día a día a más mujeres en el Mundo.

A todos los profesionales de la salud que sacrifican horas de descanso dedicándolos a encontrar nuevas formas de diagnosticar, tratar y bajar la mortalidad por Cáncer de Cuello Uterino.

ABREVIATURA

HPV.	PAPILOMA VIRUS HUMANO
PCR.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
FDA.	FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION
SOLCA.	SOCIEDAD DE LUCHA CONTRA EL CÁNCER
CA.	CÁNCER
LEEP.	PROCEDIMIENTO DE EXTIRPACIÓN ELECTROQUIRÚRGICA CON ASA
ADN.	ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
LIS.	LESIÓN ESCAMOSA INTRAEPITELIAL
HSIL.	LESIÓN INTRAEPITELIAL SUBSECUENTE DE ALTO RIESGO
PCR-RFLP.	POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN
Q-PCR.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL
LIEAG.	LESIÓN INTRAEPITELIAL DE ALTO GRADO
ION.	INSTITUTO ONCOLÓGICO NACIONAL
INSPI.	INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA

RESUMEN

Introducción: El Virus del Papiloma Humano (VPH) está asociado directamente con el desarrollo del cáncer de cérvix. **Objetivo:** tipificación y asociación de VPH de alto riesgo en pacientes con LIEAG y cáncer de cérvix que acudieron a la consulta externa del ION SOLCA-GUAYAQUIL, durante el período 2013- 2014. **Metodología:** el presente estudio fue de tipo descriptivo, observacional y analítico, los exámenes utilizados fueron el papanicolaou, colposcopia, biopsia de cérvix y tipificación viral del VPH mediante ADN, las muestras analizadas fueron de 175 pacientes, **Resultados:** el subtipo detectado con mayor frecuencia fue el genotipo 16 (25%), seguido del 58 (12.50%). El papanicolau ha demostrado ser uno de los pilares fundamentales en el cribado para detectar LIEAG y Cáncer de Cérvix. **Conclusiones:** el virus causante del Cáncer de Cérvix y LIEAG de mayor frecuencia fue el genotipo 16 (0,44) y el 18 en un (0,024), y el genotipo 58 (0,26), cabe indicar que al realizar el cribado junto con la tipificación viral demostró ser unos de los mejores diagnósticos para detectar la presencia del virus y poder ayudar a la prevención del cáncer de cérvix.

Palabras clave: Genotipificación, LIEAG, Papiloma Virus Humano, Cáncer de Cérvix.

ABSTRACT

Introduction: Human papilloma Virus (HPV) is directly associated with cervical cancer development. **Objective:** Typification and association of highly presence HPV for High Risk Squamous Intraepithelial lesions (HRSIL) and cervical cancerpatients seekingfor treatment through external consultation at ION SOLCA-GUAYAQUIL, during period 2013-2014. **Methodology:** The present study was of descriptive observational and analyticaltypes, the examinations used, these were papanicolaou, colposcopy, cervical biopsy and viral typification of HPV through DNA, samples analyzed, these were from 175 patients, Results: Detected subtype with higher frequency was the genotype 16 (25%), followed by 58 (12.50%). Papanicolaou has shown to be one of the fundamental pillars on cribado to detect HRSIL and cervical cancer. **Conclusions:** Virus causing cervical cancer and HRSIL of higher frequency was the genotype 16 (0,44) and 18 (0.024), and the genotype 58 (0.26), for instance, cribado test along with viral typification shown to be one of the best diagnostic tools to detect virus presence and for instance, to be able to prevent cervical cancer.

Keywords: Geno-typification, HRSIL, Human papilloma virus, Cervical cancer.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	pág.
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
ABREVIATURA	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INDICE DE CONTENIDO	X
INDICE DE TABLAS	XIII
INDICE DE GRÁFICOS	XIV
INDICE DE ANEXOS	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos Específicos	4
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Marco referencial	7

4.2. Marco teórico	9
<i>4.2.1. Papiloma virus humano y embarazo</i>	<i>9</i>
<i>4.2.2. Identificación de mecanismos de transmisión del virus papiloma humano en mujeres infectadas</i>	<i>9</i>
<i>4.2.3. Evaluación del Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano</i>	<i>10</i>
<i>4.2.4. Papilomavirus Virus Humano (VPH)</i>	<i>11</i>
<i>4.2.5. Genotipos de VPH</i>	<i>11</i>
<i>4.2.5.1. Genotipificación y secuenciación</i>	<i>12</i>
<i>4.2.6. Genética</i>	<i>13</i>
<i>4.2.7. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéuticos</i>	<i>14</i>
<i>4.2.7.1. Diagnóstico</i>	<i>15</i>
<i>4.2.7.2. Pcr en tiempo real</i>	
5. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	16
6. MÉTODO	16
6.1. Justificación de la elección del método	16
6.2. Diseño de la investigación	16
<i>6.2.1. Población y muestra</i>	<i>17</i>
<i>6.2.2. Técnica y recogida de datos</i>	<i>17</i>
<i>6.2.3. Técnica y modelos de análisis de datos</i>	<i>18</i>
<i>6.2.3.1. Fase 1 Selección y recolección de datos</i>	<i>18</i>

<i>6.2.3.2. Fase 2 Toma de muestra</i>	<i>18</i>
<i>6.2.3.3. Fase 3 Extracción del materia genético</i>	<i>19</i>
<i>6.2.3.4. Fase 4 estudio del Genotipo</i>	<i>20</i>
<i>6.2.3.5. Análisis estadístico</i>	<i>21</i>
7. RESULTADOS	22
7.1. UNIVERSO Y TAMAÑO DE MUESTRA	22
8. RESULTADOS	23
8.1 Análisis de los resultados	38
9. CONCLUSIONES	40
10. VALORACIÓN CRÍTICA DE LA INVESTIGACIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla # 1. Distribución del número de casos de acuerdo al diagnóstico y al tipo de lesión de alto grado y cáncer de cérvix.	23
Tabla # 2. Presencia de los genotipos de VPH y cáncer de cérvix.	24
Tabla # 3. Presencia de los genotipos de VPH y lesión de alto grado.	26
Tabla # 4. Distribución del número de casos en función a la presencia del material genético en la muestra de cepillado cervico vaginal.	27
Tabla # 5. Distribución de los genotipos encontrados en muestra cepillado cervico vaginal.	28
Tabla # 6. Correlación entre el examen de histopatológico previo y la presencia de HPV.	31
Tabla # 7. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV.	32
Tabla # 8. Correlación entre el examen Biopsia de exocérvix por colposcopia de previo y la presencia de HPV.	34
Tabla # 9. Correlación entre el examen Papanicolaou de previo y la presencia de HPV.	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico # 1. Distribución del número de casos de acuerdo al diagnóstico y al tipo de lesión de alto grado y cáncer de cérvix.	23
Gráfico # 2. Presencia de los genotipos de VPH y cáncer de cérvix.	25
Gráfico # 3. Presencia de los genotipos de VPH y lesión de alto grado.	26
Gráfico # 4. Distribución del número de casos en función a la presencia del material genético en la muestra de cepillado cervico vaginal.	27
Gráfico # 5. Distribución de los genotipos encontrados en muestra cepillado cervico vaginal.	30
Gráfico # 6. Correlación entre el examen de histopatológico previo y la presencia de HPV.	31
Gráfico # 7. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV.	33
Gráfico # 8. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV.	35
Gráfico # 9. Correlación entre el examen Papanicolau de previo y la presencia de HPV.	36

ÍNDICE DE ANEXO

	pág.
Anexo # 1. Consentimiento informado	47
Anexo # 2. Encuesta	48
Anexo # 3. Protocolo de toma de muestra, SOLCA	49
Anexo # 4. Protocolo de extracción del material genético, mediante el <i>kit QuiaGen</i> .	40
Anexo # 5. Imagen de extracción del material genético	52
Anexo # 6. Protocolo de amplificación	53
Anexo # 7. Imagen del proceso de amplificación mediante q-PCR.	55
Anexo # 8. Imagen de los productos amplificados mediante. PCR convencional	56
Anexo # 9. Bases de datos	57
Anexo #10. Hoja de resultados	60

1. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) es el único virus asociado directamente con el desarrollo del cáncer en el tracto ano-genital, señalándosele como su agente etiológico. Infecta las mucosas y las superficies cutáneas, y provoca la aparición de verrugas o tumores epiteliales. Hasta el momento se han logrado identificar más de doscientos tipos virales clasificados según la homología de sus genomas (Vargas-Hernández, 1996 y Walboones, 1999).

Según Gil (2009) la infección por VPH es un tema de estudio amplio que está en constante discusión debido a la identificación de una serie de subtipos que se relacionan con verrugas genitales o cáncer de cérvix. Gil y colaboradores han reportado que los subtipos que tienen una mayor relación con estos problemas son el 16 y 18. Pese a esto, existen varios factores que pueden inducir una carcinogénesis de cérvix como la paridad, el uso de contraceptivos orales, el tabaquismo y la co-infección VIH.

Como ya se mencionó, estudios han establecido al VPH como principal agente etiológico del cáncer de cérvix, demostrándose que el 95% de mujeres con cáncer cervicouterino están infectadas con algún genotipo del VPH. La transmisión de este virus ocurre de persona a persona por contacto directo básicamente vía sexual (Cortes y Leal, 2001). Estudios han demostrado también que cerca del 12% de la incidencia mundial de cáncer de cervix se debe al VPH, siendo el genotipo 16 el de mayor prevalencia. Por tal motivo la fabricación de la vacuna se han perfilado por este genotipo (Sanclemente, 2003).

El cáncer de cérvix es la neoplasia maligna más común en los países que se encuentran en vía de desarrollo, donde la incidencia de esta enfermedad llega a 40 casos cada 100,000 mujeres. Se ha estimado que anualmente se presentan aproximadamente 500,000 casos nuevos en el mundo de los cuales 80% ocurre en países en vías de desarrollo. Estudios han descrito que la infección por el VPH es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente en las mujeres y que algunos factores pueden influir en la infección como son: la edad, la raza, alto consumo de bebidas alcohólicas, tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, el número de parejas sexuales, el trauma cervical durante el parto, factores genéticos y ciertos factores hormonales endógenos y asociados con el embarazo (Hernández-Girón *et al*, 2005).

En la actualidad, ensayos moleculares son utilizados para el diagnóstico y la tipificación de VPH: el *test* de captura de híbridos (*Hybrid Capture, Digene Diagnostics, INC. Silver Spring, Maryland, EE.UU*) aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*), y la reacción en cadena de polimerasa (PCR en tiempo real) (Jastreboff, 2002).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad no existe una prueba serológica confiable que permita diagnosticar la infección por VPH; lo que dificulta el desarrollo de investigación en cuanto a VPH. El desarrollo de pruebas diagnósticas ha enfrentado los siguientes problemas: a) existe poco conocimiento sobre los mecanismos de respuesta inmune del huésped a la infección y la evasión de esta respuesta por parte del virus; b) no poder disponer de una proteína viral suficientemente antigénica y en cantidades abundantes para desarrollar la prueba; y c) la incapacidad de poder cultivar el virus *in vitro*, debido a que éste sólo prolifera en células diferenciadas permisivas y éstas no pueden mantenerse en cultivo (Molden *et al*, 2005).

Puesto que el VPH es considerado el agente etiológico del cáncer cervical, y se ha establecido como el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad, surge la necesidad de disponer de pruebas que permitan el diagnóstico temprano de la infección por VPH (Jastreboff, 2002).

Aunque las mayorías de lesiones que produce el VPH son benignas, existen algunos genotipos que mantienen una íntima relación con cáncer de cérvix, cáncer anal y la epidermodisplasia verruciforme. Por este motivo las lesiones causadas por VPH se han clasificado en lesiones de alto, mediano y bajo riesgo de acuerdo a su poder oncogénico. San Clemente reporta que en el 2013 el 11.8% de la incidencia de cáncer de cérvix a nivel mundial se debe al genotipo VPH16 seguido por el VPH18.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Tipificación molecular del Virus Papiloma Humano en muestras de mujeres con lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix atendidas en el Área de Colposcopia en Consulta Externa de SOLCA. Periodo 2013-2014.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la frecuencia de las lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix en pacientes atendidas en el Área de Colposcopia en Consulta Externa de SOLCA.
2. Determinar el genotipo de mayor frecuencia en las muestras estudiadas.
3. Analizar el diagnóstico clínico de Papanicolaou y Colposcopia en relación al genotipo presente en las muestra de hisopado cervico vaginal de las pacientes atendidas en la consulta externa de SOLCA.

4. MARCO TEÓRICO

El virus del papiloma humano es un tema de estudio que está en constante discusión debido a una serie de subtipos que se relacionan con verrugas genitales o cáncer de cérvix, Gil, (2009) expresa que los subtipos que tienen una mayor relación con estos problemas son el 16 y 18, pero existen varios factores que pueden inducir una carcinogénesis de cérvix como la paridad, uso de contraceptivos orales, tabaquismo y VIH (Angel, 2009).

Estudios establecen al VPH como principal agente etiologico del cancer de cervix y se ha demostrado que el 95% de mujeres con cancer cervicouterino estan infectadas con algun genotipo del VPH. La Transmisión de este virus ocurre de persona a personas por contacto directo basicamente via sexual. (Cortés, & Leal, 2001). Estudios han demostrado que cerca del 12% de le incidencia mundial de cancer de cervix se debe al Virus del papiloma Humano, siendo el genotipo 16 el de mayor prvalencia, po tal razon los estudios por la fabricación de una vacuna se han perfilado por este genotipo (Sanclemente, 2003).

Aunque las mayorias de lesiones que produce el virus del papiloma humano son benignas, existen algunos genotipos que mantienen una intimarelation con cancer de cervix, cancer anal y la epidermodisplasia verruciforme, por este motivo las lesiones causadas por VPH se han clasificado en lesiones de alto, mediano y bajo riesgo de acuerdo a su poder oncogenico (Sanclemente, 2003).

Sanclemente, 2013 expresa que el 11.8% de la incidencia de cáncer de cervix a nivel mundial se debe al genotipo VPH16 seguido por el VPH18. El conocimiento de la biologia del VPH es importante para poder entender la carcinogénesis cervical, se ha descrito evidencia epidemiologica y molecular

sobre la relación del papiloma virus humano en el desarrollo de la carcinogénesis (De la Fuente-Villarreal et al, 2010).

El cáncer cervicouterino pertenece al grupo de las principales neoplasias malignas que afecta a las mujeres de nuestro país y todo el mundo, la infección por vph es un importante problema de salud pública, para lo cual se han identificado a los sectores con mayor riesgo debido a factores como inicio temprano de la vida sexual y múltiples parejas sexuales (De la Fuente-Villarreal et al, 2010).

CA de cervix es el cáncer más común en los países que se encuentran en vía de desarrollo, donde la incidencia de esta enfermedad llega a 40 casos cada 100.000 mujeres. Anualmente se estima que se presentan aproximadamente 500.000 casos nuevos en el mundo de los cuales 80% ocurre en países en vías de desarrollo (Hernández-Girón et al, 2005).

Estudios han descrito que el VPH es una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente en las mujeres, algunos factores que pueden influir en la infección son la edad, la raza, alto consumo de bebidas alcohólicas, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, número de parejas sexuales, trauma cervical durante el parto factores genéticos y ciertos factores hormonales endógenos y asociados con el embarazo (Hernández-Girón et al, 2005).

Durante el embarazo ocurren diversos cambios fisiológicos e inmunológicos en el epitelio cervical que predisponen un incremento de riesgo de infección por VPH y su progreso, estudios han determinado una prevalencia de infección de VPH de alto riesgo de 37.2% (Hernández-Girón et al, 2005).

4.1. Marco referencial

Genotipificación del virus de papiloma humano en mujeres con hallazgo citológico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) o de significado indeterminado (ASC-US) en Bogotá, Colombia

El virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo asociado al cáncer cervical, y es la causa de muerte más común por cáncer entre las mujeres en Colombia. Por tanto, crece el interés a nivel mundial y nacional por mejorar las estrategias de control y diagnóstico de la infección; incluyendo técnicas de diagnóstico molecular que identifiquen y diferencien tipos virales específicos para así tener mejor entendimiento de la dinámica del virus en la historia natural de la infección por VPH.

En el presente trabajo se detectó el VPH en 363 pacientes diagnosticadas con lesiones ASC-US o LSIL en su citología, pertenecientes al programa de tamizaje de cáncer de cérvix de la EPS Sanitas. Sólo a 302 de estas muestras se les pudo realizar genotipificación por Reverse Line Blot, de éstas el 20,5% (62/302 pacientes) fueron positivas para vph; los tipos virales de alto riesgo estuvieron presentes en el 82,2% y los de bajo riesgo, en el 17,8%. Por primera vez se realiza un acercamiento a la descripción de tipos virales específicos, encontrados en muestras con diagnóstico citológico de ASC-US o LSIL en Bogotá (Farfán., García., Arias., Morales., Isaza & Aristizábal, 2010).

Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP

Antecedentes: La asociación de diferentes genotipos del virus del papiloma humano (VPH) con el cáncer cervical es bien conocida. Sin embargo, existe

poca información acerca de su asociación con lesiones pre-cancerosas. Objetivo: Evaluar la frecuencia de los diferentes genotipos de VPH en lesiones cervicales precancerosas. Material y métodos: Una muestra cervical se obtuvo mediante cepillado en 15 mujeres con lesiones de bajo grado y 40 mujeres con lesiones de alto grado, sometido a la conización por asa electroquirúrgica (LEEP). La detección y tipificación del virus se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Resultados: Todas las mujeres fueron infectadas con el VPH. El ochenta y cinco por ciento de las muestras se tipificaron. Un único subtipo de HPV se encontró en 76% de las mujeres. El catorce por ciento tenía una infección con múltiples subtipos y en el 10%, el genotipo viral no fue identificado. Los subtipos más frecuentes corresponden a VPH 16, VPH 52 y el VPH 53. Conclusiones: Existe una alta tasa de la infección por VPH de alto riesgo oncogénico entre estas mujeres (Aedo., Melo., García., Guzmán., Capurro & Roa, 2007).

Evaluación del Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección Por el virus del papiloma humano.

Objetivo: Comparar la eficacia de la citología y la colposcopia en el diagnóstico de las lesiones cervicales del virus del papiloma humano. a) Determinar la especificidad y sensibilidad del Papanicolaou en una clínica de displasias, b). Determinar la sensibilidad y especificidad de la colposcopia, c) relacionar ambos hallazgos con el diagnóstico definitivo (histopatológico), d) Conocer los factores de riesgo de mayor prevalencia en la población de estudio con infección por el virus del papiloma humano. Resultados y Conclusiones: La colposcopia mostró una sensibilidad del 83% contra 41% de Papanicolaou y una especificidad del 66% menos que el 86% del frotis. Los factores de riesgo hallados coinciden con los informados en el resto del mundo: número de parejas sexuales, multiparidad e iniciación temprana de actividad sexual (Zamudio., Zepeda., Rodríguez & Tenorio, 2001).

4.2. Marco teórico

4.2.1. Papiloma virus humano y embarazo

Durante la gestación ocurre una leve inmunodepresión celular, aparecen paulatinamente cambios hormonales, presencia de mayor vascularidad y cambios inmunológicos que permitan el desarrollo de condilomas. En las lesiones asintomáticas y en las extensas se utiliza ácido tricloroacético para el tratamiento, las grandes se extirpan después del primer trimestre (Vargas-Hernandez, 1996).

Tras descartar la presunción de cáncer se debe observar hasta que finalice el embarazo y se deberá continuar con tratamiento durante el post-parto. Existe la posibilidad de contagio de la madre al feto durante el parto o intrauterino tras el contacto con el líquido amniótico a pesar de aquello no es necesaria la cesárea hasta que no exista obstrucción del canal del parto (Vargas-Hernandez, 1996).

4.2.2. Identificación de mecanismos de transmisión del virus papiloma humano en mujeres infectadas

Las infecciones por HPV son mundialmente conocidas por su asociación al cáncer cervicouterino tras la presencia de indicadores que vuelven a las personas vulnerables al contagio inminente como pueden ser: inicio temprano de la actividad sexual ya sea genital, anal u oral, varias parejas sexuales, multiparidad, fómites, vía transversal, iatrogenia médica tras la exploración ginecológica con el mismo guante y material mal esterilizado o reutilizado (Hernández-Colín et al, 2006).

4.2.3. Evaluación del Papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano

El HPV es el causante de una serie de patologías benignas localizadas en la piel y malignas que tienen relación por la presencia de verrugas en membranas mucosas y se asocian como etiología principal para el cáncer cervicouterino (Zamudio et al, 2001).

El tratamiento puede ser complicado debido a que no existe evidencia de un tratamiento específico y las técnicas utilizadas tanto tópicos y ablactivas, solo consideran la eliminación de la verruga superficialmente sin considerar aquellos agentes que circulan por el torrente sanguíneo o las que están alrededor de las lesiones (Zamudio et al, 2001).

4.2.4. Papilomavirus virus humano (vph)

Es un virus oncogénico, no envuelto, de ADN circular doble cadena, que pertenece a la familia Papoviridae. Su genoma está formado por 7900 pares de base, posee una cápside icosaédrica, de un diámetro de 50 a 55 nm y que está compuesta por 72 capsómeros (Molden, 2005 y Jastreboff, 2002).

El cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública a nivel mundial se encuentra en un 99,8% de todos los casos con neoplasia intracervical, la infección por VPH es un factor fuertemente predictivo de las lesiones intraepiteliales escamosas cervicales subsecuentes (SIL), el cáncer cervical es una enfermedad prevenible porque tiene una causa conocida, puede ser prevenido con un cuidadoso tamizaje y un seguimiento adecuado, la presencia del VPH aumenta el riesgo relativo de desarrollar cáncer, 250 veces más que aquellas pacientes no portadoras, La línea epitelial del tracto anogenital es el blanco de

la infección, al momento se han descrito más de 100 genotipos distintos (González, 2006).

4.2.5. Genotipos de VPH

Los genotipos del VPH que afectan al tracto genital (cerca de 25 genotipos) son clasificados por su potencial malignidad en tipos de alto (16, 18, 45, 46, 53, 55, 56, 58, 61, 66, 68, 70, 73), mediano (31-35, 51, 52) y bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44) y 6, 11, 42, 43, 44 se asocian a lesiones genitales benignas, como condilomas (lesiones intraepiteliales escamosas subsecuentes bajo riesgo (SIL). Las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 están involucrados en la patogénesis de lesiones intraepiteliales escamosas subsecuentes de alto riesgo (HSIL) y cáncer invasor. Entre las cepas de más alto riesgo, los tipos VPH 16 y VPH 18 están altamente implicados en los carcinomas cervicales. EL ADN del VPH 16 ha sido localizado en más del 50 % de los carcinomas de células escamosas, mientras que el ADN del VPH 18 ha sido encontrado en más de la mitad de los casos de adenocarcinomas (Hernández-Girón, 2005).

Los riesgos para el desarrollo de cáncer cervical difieren mucho entre los individuos infectados con VPH anogenital de bajo riesgo y personas infectadas con VPH anogenital de alto riesgo. Por esta razón, será valioso conocer el genotipo exacto presentes en las muestras clínicas, los genotipos de estudio han sido en gran medida limitada a estudios epidemiológicos y han utilizado una variedad de tecnologías, algunas de las que son relativamente de baja resolución que limitan a los genotipos que puede identificar (Aedo *et al*, 2007).

El VPH del hombre, es ubicuo en las comunidades, produciendo infecciones en la mayoría de los niños, como se demuestra en el hecho de que la mayoría de los adolescentes que ya tienen anticuerpos. Es probable que la gran mayoría de las infecciones sean subclínicas (Picconi, 2000).

4.2.5.1. Genotipificación y secuenciación

La clasificación del HPV está determinada por la secuencia nucleotídica de la región L1 del Genoma que codifica la proteína principal de la capsida y es la región del virus que se encuentra altamente conservada (Aedo et al, 2007). Los tipos de HPV que infectan el tracto genitourinario pueden ser de alto riesgo y de bajo riesgo según la potencia oncogénica o neoplásica que contenga el virus presente (Picconi et al, 2000).

El método más sensible para realizar la detección de HPV es la Reacción en cadena de la polimerasa, se han descrito diferentes protocolos de PCR para poder detectar una amplia gama de genotipos de HPV partiendo de secuencias específicas del genoma viral, para poder genotipificar el HPV se han utilizado distintos métodos entre ellos los más usados son (PCR-RFLP) y Secuenciación (Aedo et al, 2007).

Capogrosso y colaboradores estudiaron el nivel de conocimiento que tenían pacientes sobre el VPH en una población de 934 de los cuales solo el 51. % tenía conocimiento sobre la infección y los efectos del vph, mientras que solo el 36,5 % sabía sobre la existencia de la vacuna (Capogrosso et al, 2014).

Por otro lado el papel de los factores genéticos se ha convertido en otro factor importante ya que pueden modificar o estar influenciados en la carcinogénesis, las razones de por qué algunos individuos son más susceptibles

a infecciones por vph mientras que otros no logran desarrollar un proceso oncogénico, no están claras, pero podrían obedecer a variaciones génicas (Habbous et al, 2014 y Zamudio, 2001).

4.2.6. Genética

Estudios recientes han demostrado la capacidad transformante de estos virus, el modo específica de su integración, la participación de genes virales en el mecanismo de la transformación y el control intracelular en la modulación de su expresión, un componente importante es la persistencia del virus y la influencia de otros factores: endógenos, dependientes del huésped o exógenos relacionados con el medio ambiente que pueden modificar la expresión o los efectos del HPV (Melo, García, 2010).

La transformación celular por los VPH se debe al expresión de dos genes tempranos, E6 y E7. Las proteínas E6 y E7 actúan interfiriendo con la función de las proteínas celulares Rb y p53, concretamente, E7 se une a Rb, y E6 activa la degradación de p53 por una proteólisis mediada por ubiquitinas los productos genéticos se designan E (early-tempranos) (Muñoz-Sandoval, 2012).

Las alteraciones de las células cancerosas son tan variadas que pueden estudiarse desde distintos puntos de vista: locales o germinales, tumorales y tisurales, finamente genotípica y moleculares. El proceso canceroso ejerce una influencia directa sobre la propia célula y su vecindad (efecto local) o sobre la totalidad del organismo (efecto generalizado o sistemático) (Muñoz, 2012).

4.2.7. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéuticos

El HPV es uno de los principales agentes etiologicos causantes de cáncer anogenital con diseminacion mundial imposible de erradicarlo debido al fracaso de antirretrovirales, a su alta recidivancia y que no existan agentes farmacológicos específicos, es necesario implementar la prevención con toma de muestras citologicas, semestrales o anuales, el uso de mecanismos de barrera masculinos sumados a los buenos habitos higienicos (Vargas-Hernandez, 1996).

Las infecciones por el virus de papiloma humano se clasifican en asintomaticas cuando no se observan aormalidades y el diagnóstico se realiza mediante tecnicas moleculares, Subclínicas cuando se detectan lesiones por colposcopia y clinicas cuando se presentan condilomas acuminados (Vargas-Hernandez, 1996).

La alta incidencia y prevalencia de las infecciones por HPV es debida a la alta promiscuidad sexual entre los individuos. La transmisión sexual es alta pero existen otros mecanismos tales como: autoinoculación, fómites, iatrogenia tras el uso del mismo guante en la exploración ginecológica y anal, con material no esterilizado o reutilizado y en mujeres núbiles, confirmado con PCR (Vargas-Hernandez, 1996).

Las mujeres blancas tienen mayor posibilidad de presentar condilomas que las mujeres negras 2:1 entre los 16 y 25 años, también hay mayor incidencia de malignidad en el tejido femenino que en el masculino debido a las zonas de transición (ZT) que las mujeres presentan en su cavidad genital pero esta posible malignizacion es debida o no a causa de la inmunidad celular dependiente de cada individuo, existiendo la posibilidad de involución espontanea de las lesiones (Vargas-Hernandez, 1996).

4.2.7.1. Diagnóstico

La electroforesis se la ha definido como el procedimiento *IN VITRO* que permite separar biomoléculas basándose en la carga eléctrica que contienen mediante un campo eléctrico, para este procedimiento se utilizan capilares que miden aproximadamente de 75 a 100 cm de largo con diámetros internos de 50 – 70 – 100 um y diámetros externos de 300 a 400 um (Castagnino, 2000).

La ventaja de esta técnica se basa en el capilar de sílice fundida que con regularidad se cubre con una capa de prolimina para concederle mayor resistencia, la luz UV pasa por una ventana de tal manera que se puede visualizar el estado de la electroforesis, mediante este procedimiento se puede separar proteínas, ácidos nucleicos, cationes, aniones y macromoléculas (Castagnino, 2000).

La electroforesis capilar es una técnica usada en varias ramas una de ellas es la Biomédica y mediante este proceso podemos separar proteínas, péptidos, ADN, y realizar análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas de abuso y pericias forenses (Castagnino, 2000).

4.2.7.2. Pcr en tiempo real

La qPCR o Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica basada en la PCR convencional que permite obtener copias de cadenas de ADN a partir de un ADN molde brindando una gran cantidad de datos, especificidad y sensibilidad en el proceso (Vninueza-Burgos, 2009).

Una de las ventajas de la qPCR es que el procedimiento completo ocurre en el termociclador, de esta manera se disminuyen riesgos de contaminación, el sistema

esta compuesto por dos componentes: elementos opticos y marcadores fluorescentes que permiten cuantificar la amplificación (Vinuesa-Burgos, 2009).

5. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

El 80 % de las pacientes con LIEAG y Ca de cérvix atendidas en el área de Colposcopia de la consulta externa del ION-SOLCA Guayaquil presentan VPH de alto riesgo.

6. MÉTODO

6.1. Justificación de la elección del método

Es tipo cuantitativo debido a que se conocerá la presencia de los genotipos del VPH en la población de estudio, y cualitativo ya que se describe las patologías causadas por el VPH de acuerdo al cuadro clínico de las pacientes.

6.2. Diseño de la investigación

El presente estudio fue de tipo descriptivo-observacional y analítico debido a que tiene como propósito a partir de variables a investigar cómo se encuentran en la población seleccionada las variables genotípicas del Papiloma virus humano, según el periodo de estudio y de corte transversal, debido a que se estudia las variables en un determinado momento, haciendo un corte en el tiempo, ya que tiene como objetivo determinar la tipificación molecular en las muestras de mujeres con lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix atendidas en el Área de Colposcopia en Consulta Externa ION-SOLCA Guayaquil.

6.2.1. Población y muestra

En conjunto la población de este estudio estuvo constituido por todas las mujeres que acudían al Área de Consulta Externa de Colposcopia de ION-SOLCA Guayaquil en el período de estudio 2013-2014. La muestra se tomaba en aquellas mujeres con diagnóstico de lesión cervical de alto grado y/o cáncer de cérvix diagnosticada por PAP o biopsia de colposcopia.

6.2.2. Técnica y recogida de datos

En el Área de Colposcopia de SOLCA se canalizó la entrevista de cada paciente y se les realizó un examen físico completo, se les explicó los objetivos del proyecto y se obtuvo un consentimiento informado por escrito de participación. Se llenó además una hoja de datos que contenía información personal así como de su PAP, el resultado de la colposcopia y las biopsias. Se realizó además un consejería a cada caso de manera particular (Anexo # 1)

Mujeres en etapa reproductivas: de 20 a 35 años (en esta variable se incluyó los números de pareja sexual).

Grupos etarios: se tomaron en cuenta de 20-29 años y 30-39 años.

Raza: Esta variable se determinó mediante una clasificación racial de nuestro medio las razas serán indígena, mestiza, blanca, afro-ecuatoriana y asiática.

6.2.3. Técnica y modelos de análisis de datos

El presente estudio se realizó en cuatro fases:

6.2.3.1. Fase 1 Selección y recolección de datos

Se seleccionó a todas las mujeres derivadas a la consulta externa de Colposcopia con un Papanicolaou o un resultado de biopsia del cuello uterino que indicó lesión intraepitelial de alto grado o cáncer de cérvix.

El Papanicolaou es el método de pesquisa poblacional por excelencia, que evalúa los cambios morfológicos de las células exfoliadas en forma espontánea o inducida de células normales o patológicas del cuello uterino. Con la colposcopia realizó el estudio directo del cuello uterino con un microscopio, ácido acético al 5% y lugol para encontrar lesiones causadas por el VPH, las que resultaron positivas a lesiones se le tomo una biopsia de la zona a estudiar.

Se realizó la encuesta en la hoja de datos, se explicó el motivo del estudio y si estuvieron de acuerdo firmaron el consentimiento informado. Además de dar consejería personal a cada paciente escogida (Anexo # 2).

6.2.3.2. Fase 2 Toma de muestra

Con la paciente en posición ginecológica, se procedió a insertar cuidadosamente un espéculo hasta llegar al cérvix, luego con la ayuda de un cepillo endocervical que se inserta en el exo y parte del endocérvix en sentido de las manecillas del reloj se tomó la muestra que contenía células y mucosa que se colocó en un recipiente con medio de transporte y fue llevado al

Instituto de Biomedicina de la UCSG para procesamiento y posterior análisis. La genotipificación se realizó en el laboratorio de virología del INSPI (Anexo # 3).

6.2.3.3. Fase 3 Extracción del materia genético

Las muestras obtenidas fueron llevadas al Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, siendo colocadas a 4°C. Luego se registro con un código interno y posteriormente pasaron a congelación a -25°C hasta el análisis. Se creó una base de datos con los códigos ya establecidos de las muestras tomadas de las pacientes y demás datos recabados con la hoja de datos (Anexo # 4).

Para el análisis molecular se efectuó el proceso de extracción de ADN del hisopado cervico mediante kit comercial *QuiaGen* siguiendo el protocolo de la casa comercial (Anexo # 5).

Una vez obtenido el material genético se procedió a la amplificación, se utilizaron los *primers* My09/My11 que amplificaron fragmento de 450 bp. El análisis de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, en el laboratorio de virología del INSPI.

Oligonucleótido MY09 CGTCCMARRGGAWACTGATC

Oligonucleótido MY11 GCMCAGGGWCATAAYAATGG

Codones degenerados: M=A+C R=A+G

W=A+T Y=C+T

Tamaño del amplicón 450 pares de bases

Una vez realizada la mezcla se llevó al programa de amplificación 3 minutos a 95 °C, Posteriormente 35 ciclos que incluyeron los pasos de Desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, seguido en la fase de Hibridación de los cebadores a 55 °C por 1 minuto, la Extensión a 72 °C durante 1 minuto y Finalmente 10 minutos a 72 °C para completar el proceso de polimerización. Los productos amplificados fueron guardados a -20 °C hasta realizar la tipificación.

6.2.3.4. Fase 4 estudio del Genotipo

En el INSPI se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa empleando *primers* genéricos que se basó en el uso de los llamados “*primers* degenerados” MY9, 11 (Manos y col.) o *primers* “*consensus*”.

Estos nos permitieron amplificar un fragmento de aproximadamente 450 pares de bases, respectivamente correspondiente a la región L1 del genoma viral. Por ser esta región altamente conservada es posible de esta manera detectar un amplio espectro de VPH que habitualmente infectan el tracto ano genital.

Una vez obtenido estos productos amplificados se realizó el proceso de genotipificación para poder conocer el genotipo en la población de estudio mediante Q-PCR en la cual nos permitió visualizar la amplificación del material genético mediante la cuantificación absoluto y la visualización de una curva de amplificación.

6.2.3.5. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos fueron ingresados a una hoja electrónica de Excel para luego ser analizada con el programa estadístico SPSS versión 21.00 para Windows (IBM, SPSS, Armonk, NY, USA). Se considerará como significativas las diferencias grupales para un $p < 0.05$

7. RESULTADOS

Esta investigación tuvo como objetivo general Tipificar mediante técnica molecular el Virus Papiloma Humano en muestras de mujeres con lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix atendidas en el Área de Colposcopía en Consulta Externa de SOLCA. Periodo 2013-2014. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica Q-PCR en el INSPI e Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Los resultados obtenidos fueron analizados y expuestos en tablas y gráficos, verificando las lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix en pacientes atendidas en el Área de Colposcopía y el genotipo de mayor frecuencia en las muestras estudiadas.

7.1. UNIVERSO Y TAMAÑO DE MUESTRA

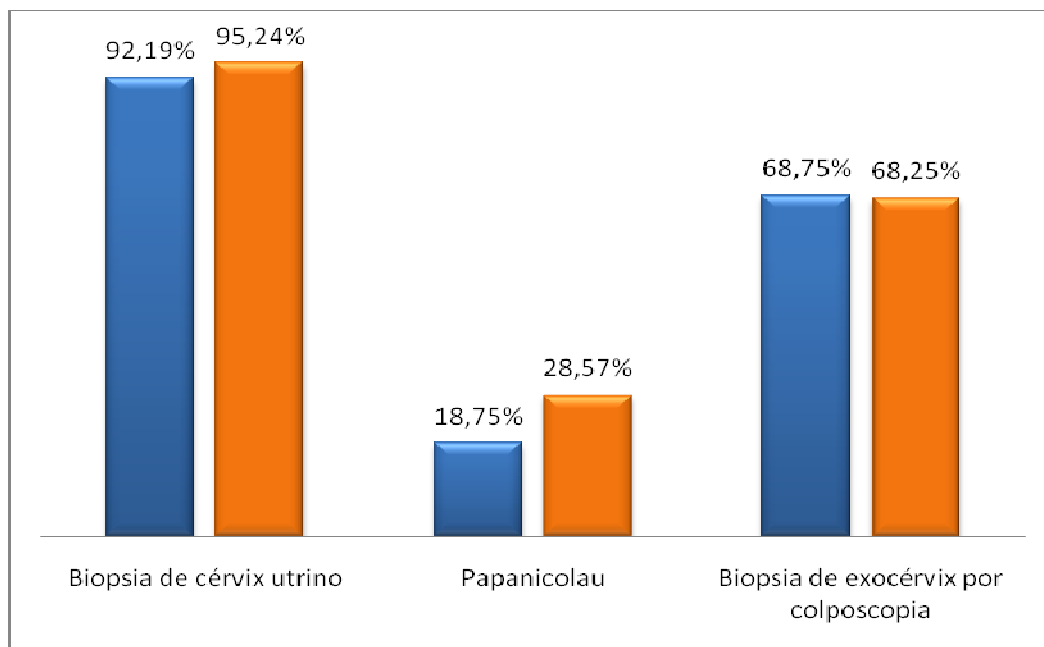
El universo lo constituyó una muestra de 175 pacientes con lesiones cervicales de alto grado y cáncer de cérvix atendidas en el Área de Colposcopía en Consulta Externa de SOLCA. Periodo 2013-2014.

8. RESULTADOS

Tabla # 1. Distribución del número de casos de acuerdo al diagnóstico y al tipo de lesión de alto grado y cáncer de cérvix

N=175	Lesiones de Alto grado (64)	Cáncer de Cérvix (63)
Biopsia de cérvix uterino	59 (92,19%)	60 (95,24%)
Papanicolaou	12 (18,75%)	18 (28,57%)
Colposcopia	44 (68,75%)	43 (68,25%)

Gráfico # 1. Distribución del número de casos de acuerdo al diagnóstico y al tipo de lesión de alto grado y cáncer de cérvix.

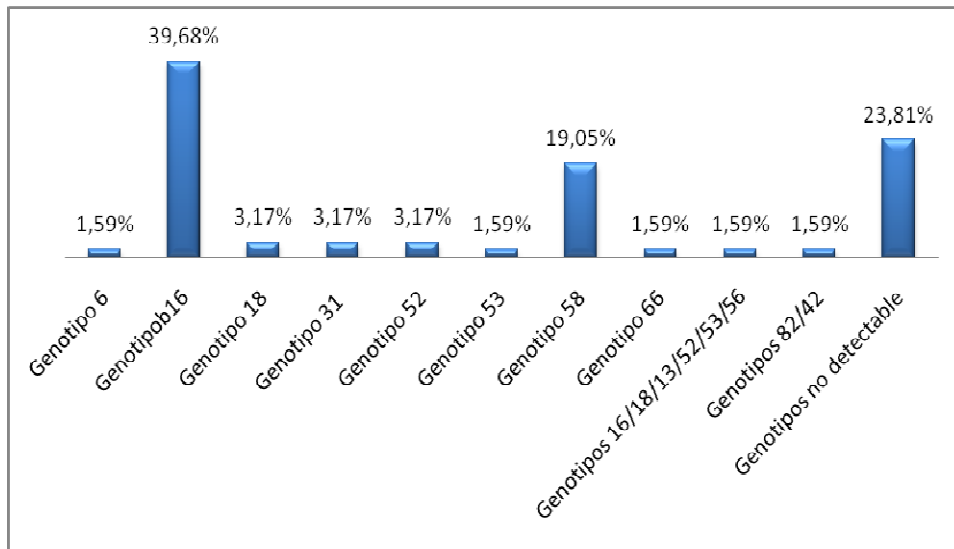


En la tabla y gráfico # 1 se observa la distribución del número de casos de acuerdo al diagnóstico el 95,24% biopsia de cérvix uterino, un 28,57% Papanicolaou y un 68,25% por colposcopia presentaron cáncer de cérvix, mientras que el 92,19% biopsia de cérvix uterino, un 18,75% Papanicolaou y un 68,75% por colposcopia para lesión de alto grado.

Tabla # 2. Presencia de los genotipos de VPH y cáncer de cérvix

Cáncer de Cérvix (63)		
Genotipos de VPH	Frecuencia	Porcentaje
Genotipo 6	1	1,59
Genotipob16	25	39,68
Genotipo 18	2	3,17
Genotipo 31	2	3,17
Genotipo 52	2	3,17
Genotipo 53	1	1,59
Genotipo 58	12	19,05
Genotipo 66	1	1,59
Genotipos 16/18/13/52/53/56	1	1,59
Genotipos 82/42	1	1,59
Genotipos no detectable	15	23,81
	63	100,00

Gráfico # 2. Presencia de los genotipos de VPH y cáncer de cérvix.

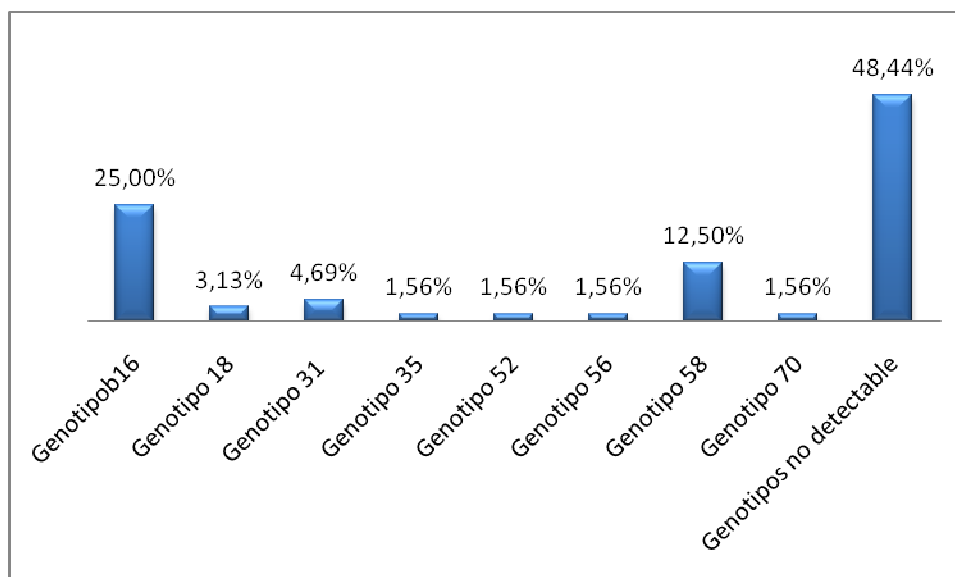


En la tabla y gráfico # 2 se observa la presencia de los genotipos de acuerdo al diagnóstico cáncer de cérvix, los genotipos de mayor frecuencia fueron el 16 (39,68%) y el 58 (19,05 %), los genotipos de menor frecuencia fueron el 6, 13, 18, 31, 42, 52, 53, 56, 66 y el 82.

Tabla # 3. Presencia de los genotipos de VPH y lesión de alto grado.

Lesiones de Alto grado (64)		
Genotipos de VPH	Frecuencia	Porcentaje
Genotipob16	16	25,00
Genotipo 18	2	3,13
Genotipo 31	3	4,69
Genotipo 35	1	1,56
Genotipo 52	1	1,56
Genotipo 56	1	1,56
Genotipo 58	8	12,50
Genotipo 70	1	1,56
Genotipos no detectable	31	48,44
	64	100,00

Gráfico # 3. Presencia de los genotipos de VPH y lesión de alto grado.

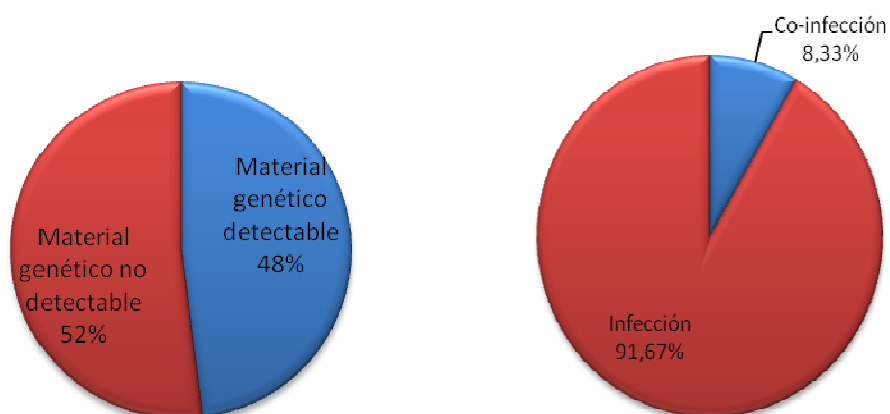


En la tabla y gráfico # 3 se observa la presencia de los genotipos de acuerdo al diagnóstico lesión de alto grado, los genotipos de mayor frecuencia fueron el 16 (25,00%) y el 58 (12,50 %), los genotipos de menor frecuencia fueron el 18, 31, 35, 52, 56, y el 70.

Tabla # 4. Distribución del número de casos en función a la presencia del material genético en la muestra de cepillado cervico vaginal.

N=175	
Material genético detectable	84 (48%)
Material genético no detectable	91 (52%)
Co-infección	7 (8,33%)
No - co-infección	77 (91,67%)

Gráfico # 4. Distribución del número de casos en función a la presencia del material genético en la muestra de cepillado cervico vaginal.



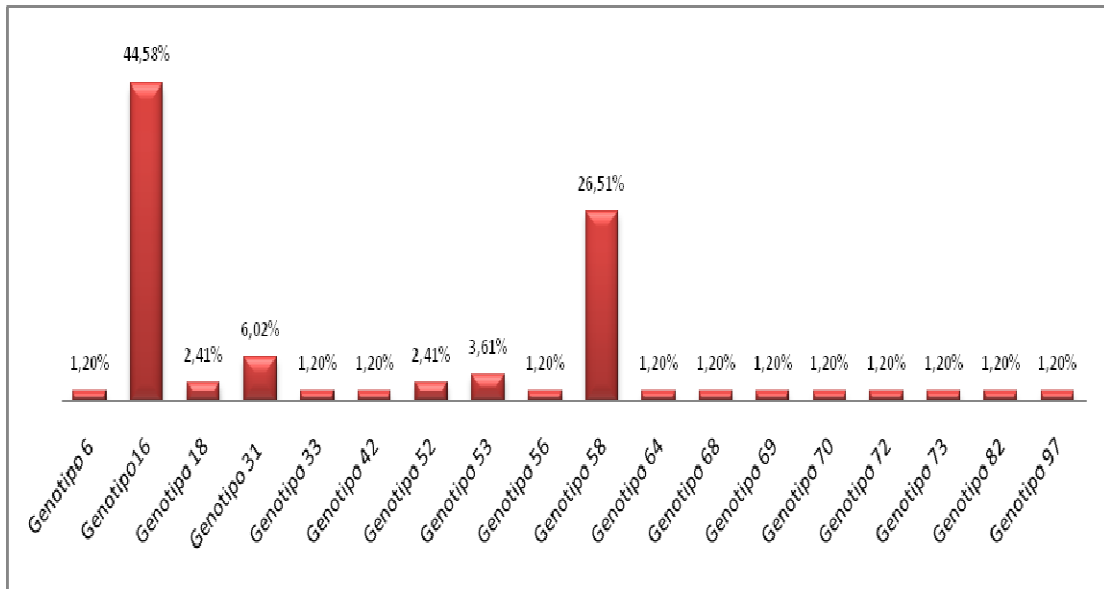
En la tabla y gráfico # 4 se observa la distribución de casos en relación al material genético, de los 175 pacientes el 52% no se encontró la presencia del material genético, y en el 84% de los pacientes se observó el ADN viral de los cuales el 91.67% se trataba de genotipos diferentes, mientras que el 8.33% presentaron co-infecciones.

Tabla # 5. Distribución de los genotipos encontrados en muestra cepillado cervico vaginal.

Co-infección	N° Casos
Genotipos 16/18/13/52/53/56	1
Genotipos 33/31	1
Genotipos 16/18/58	1
Genotipos 72/59	1
Genotipos 73/34/64/33/42/68	1
Genotipos 82/42	1
Genotipos 97/18	1

Genotipo encontrado	N° de casos (n = 84)	Frecuencia
Genotipo 6	1	0,0120
Genotipo 16	37	0,4458
Genotipo 18	2	0,0241
Genotipo 31	5	0,0602
Genotipo 33	1	0,0120
Genotipo 42	1	0,0120
Genotipo 52	2	0,0241
Genotipo 53	3	0,0361
Genotipo 56	1	0,0120
Genotipo 58	22	0,2651
Genotipo 59	1	0,0120
Genotipo 64	1	0,0120
Genotipo 68	1	0,0120
Genotipo 69	1	0,0120
Genotipo 70	1	0,0120
Genotipo 72	1	0,0120
Genotipo 73	1	0,0120
Genotipo 82	1	0,0120
Genotipo 97	1	0,0120

Gráfico # 5. Distribución de los genotipos encontrados en muestra cepillado cervico vaginal

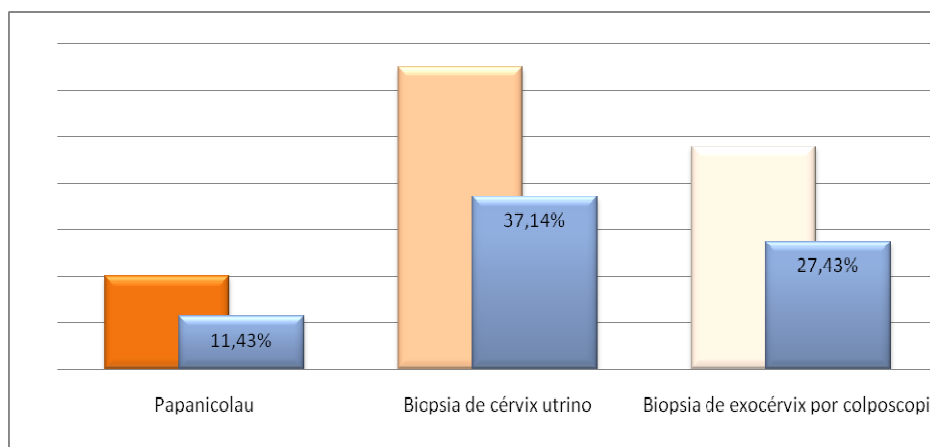


En la tabla y gráfico # 5 se muestra la distribución de los genotipos encontrados en las muestras tomadas a partir de cepillados cervico vaginales donde el genotipo 16 fue más prevalente ya que se encontró el 44.58% de la población, seguido por el genotipo 58 en un 26.51% y el genotipo 31 en un 6.02% de la población. En el 8.33% presentaron co-infecciones (16/18/13/52/53/56).

Tabla # 6. Correlación entre el examen de histopatológico previo y la presencia de HPV

Diagnóstico previo	N° de casos	%
Papanicolaou	20	11,43
Biopsia de cérvix uterino	65	37,14
colposcopia	48	27,43

Gráfico # 6. Correlación entre el examen de histopatológico previo y la presencia de HPV

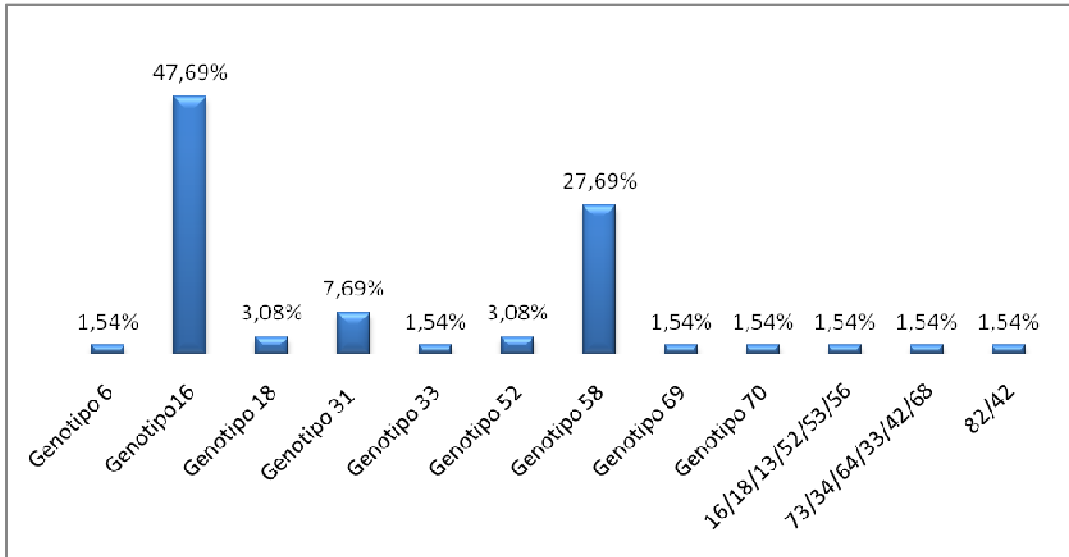


En la tabla y gráfico # 6 se observa la correlación entre los exámenes histopatológicos previos y la presencia del virus papiloma humano, en esta tabla se muestra que en los pacientes que se les realizó el Papanicolaou el 11.43% presentaron HPV, en los pacientes que se sometieron a biopsia de cérvix el 37.14% presentaron algún genotipo de HPV mientras que en los pacientes que se realizaron colposcopia el 27,43% presentaron la infección.

Tabla # 7. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV

Biopsia de cérvix uterino		
Genotipo encontrado	N° de casos (n = 65)	%
Genotipo 6	1	1,54
Genotipo 16	31	47,69
Genotipo 18	2	3,08
Genotipo 31	5	7,69
Genotipo 33	1	1,54
Genotipo 52	2	3,08
Genotipo 58	18	27,69
Genotipo 69	1	1,54
Genotipo 70	1	1,54
16/18/13/52/53/56	1	1,54
73/34/64/33/42/68	1	1,54
82/42	1	1,54
Total	65	100,00

Gráfico # 7. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV.

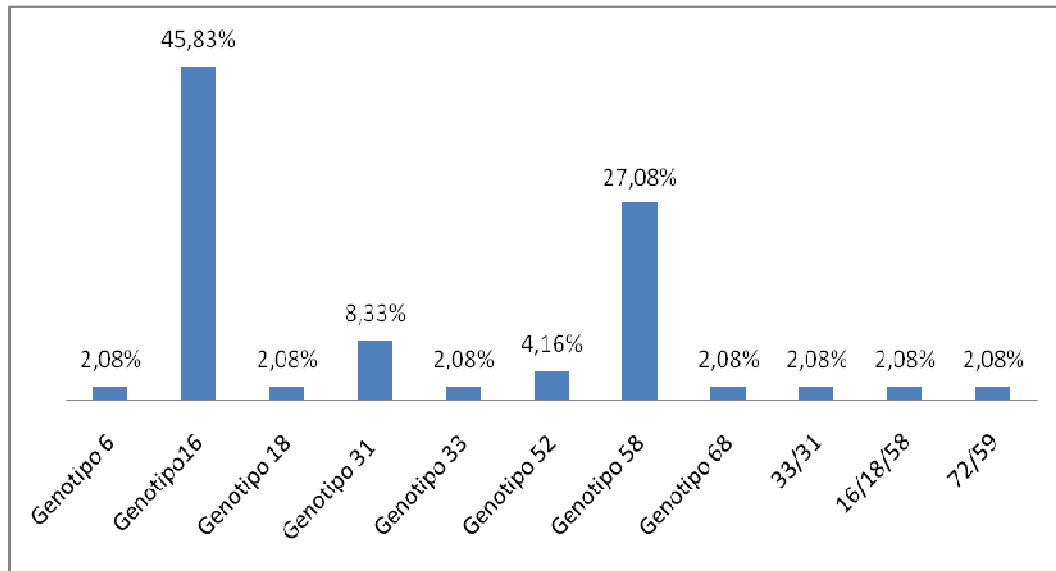


En la tabla y gráfico # 7 se muestra la correlación entre el examen de biopsia de cérvix uterino y la presencia de HPV en la cual el 47.6% presentaron el genotipo 16, el 27.69% genotipo 58 mientras que el 7.69% genotipo 31.

Tabla # 8. Correlación entre el examen por colposcopia y la presencia de HPV.

COLPOSCOPIA		
Genotipo encontrado	N° de casos (n = 48	%
Genotipo 6	1	2,08
Genotipo 16	22	45,83
Genotipo 18	1	2,08
Genotipo 31	4	8,33
Genotipo 33	1	2,08
Genotipo 52	2	4,17
Genotipo 58	13	27,08
Genotipo 68	1	2,08
33/31	1	2,08
16/18/58	1	2,08
72/59	1	2,08
Total	48	100,00

Gráfico # 8. Correlación entre el examen biopsia de cérvix uterino de previo y la presencia de HPV.

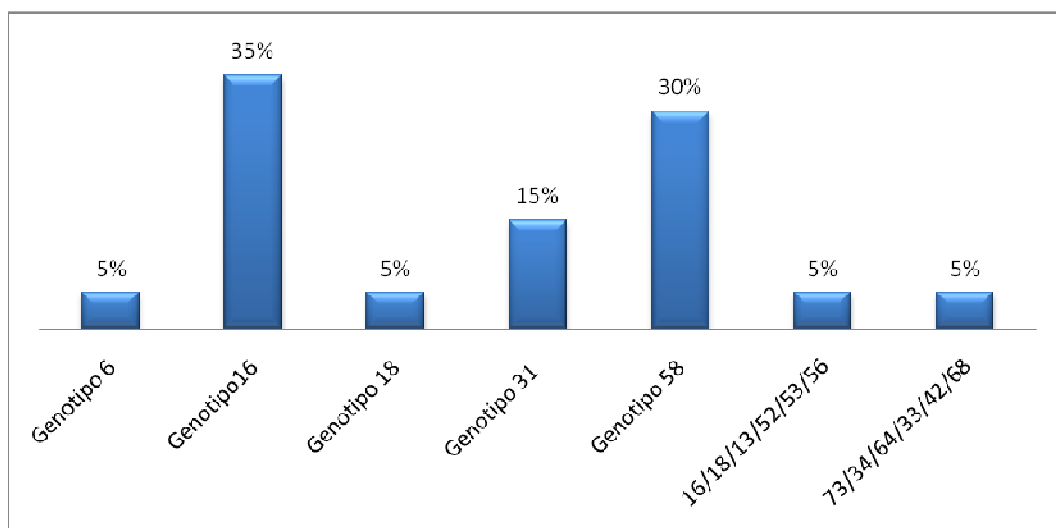


En la tabla y gráfico # 8 se observa la correlación entre los exámenes de colposcopia y la presencia del virus de papiloma humano el 45.83% presentaron el genotipo 16, el 27.08 % el genotipo 58 y el 8.33% el genotipo 31.

Tabla # 9. Correlación entre el examen Papanicolaou de previo y la presencia de HPV.

PAPANICOLAOU		
Genotipo encontrado	N° de casos (n = 20)	%
Genotipo 6	1	5,00
Genotipo16	7	35,00
Genotipo 18	1	5,00
Genotipo 31	3	15,00
Genotipo 58	6	30,00
16/18/13/52/53/56	1	5,00
73/34/64/33/42/68	1	5,00
Total	20	100,00

Gráfico # 9. Correlación entre el examen Papanicolaou y la presencia de HPV.



En la tabla y gráfico # 9 se muestra la correlación entre el Papanicolaou y la presencia del virus el 35.0% presentaron el genotipo 16, el 30.0% el genotipo 58 el 15 % presenta el genotipo 31.

8. ANÁLISIS DE DE LOS RESULTADOS

1. Del universo de pacientes estudiadas (175) con lesiones de alto grado y cáncer de cérvix para detección del VPH, se detectó el virus un 48% de las pacientes, el virus detectado con más frecuencia fue el genotipo 16(37 casos), seguido del VPH 58 (22 casos), sólo 7 casos presentaron co-infección con otros tipos de VPH (8.3%), observando como el comportamiento del virus del VPH influye firmemente en la principal causa de cáncer de cérvix,
2. De los tres tipos de pruebas diagnósticas realizadas a las pacientes en orden de elección, se comprobó la presencia del VPH en (65 casos) que fueron de biopsia durante el estudio, la colposcopia como un examen directo detecto las lesiones causadas por el virus en (48 casos) y la detección más baja se dio en *test* de Papanicolaou, coincidiendo con estudios realizados dentro de la literatura.

Los genotipos encontrados en biopsias realizadas a este de grupo de pacientes fue el 16 seguido 58 mientras que el genotipo 18 causantes de lesiones de alto riesgo y cáncer solo se lo encontraron en 2 casos.

3. La Colposcopia fue valorada como segundo mejor diagnóstico para VPH se identificó en (27,4%) del grupo en estudio, siendo los resultados muy parecidos a los de biopsia, pues identifico al genotipo 16 (22 casos), de igual forma precedido por el genotipo 58 (13 casos).
4. El Papanicolaou ha demostrado ser uno de los pilares fundamentales en el cribado para detectar lesiones de alto riesgo y de cáncer de cérvix, en este estudio ha sido uno de los que más baja presencia del VPH ha tenido con el (11,4) que corresponde a pacientes en quienes se han

detectado el VPH, guardando la misma relación que la colposcopia y la biopsia, ya que en 7 pacientes del total (20), se detectó al genotipo (16), así mismo en 6 pacientes al genotipo (58).

9. CONCLUSIONES

Los objetivos de este estudio se basaron en saber si efectivamente hay asociación de VPH de alto riesgo en pacientes con lesiones de alto riesgo y cáncer de cérvix que acudieron a la consulta externa de Colposcopia del ION SOLCA-GUAYAQUIL, durante el período 2013- 2014. Los exámenes utilizados para esta investigación fueron el Papanicolaou, la colposcopia, la biopsia de cérvix y la tipificación viral del VPH.

Obteniéndose como conclusión:

1. De las 175 pacientes en estudio la frecuencia más alta fue de cáncer de cérvix seguido de lesiones de alto riesgo, esto es debido a que eran derivadas al área de colposcopia con diagnóstico clínico o de Papanicolaou sospechoso de malignidad. Como era de esperarse, el virus causante del cáncer de cérvix y de las lesiones de alto riesgo en la mayoría de las pacientes fue el genotipo 16 (0,44%) , sin embargo para nuestra sorpresa solo encontramos al genotipo 18 en (0,02%) , en su lugar se identificó al genotipo 58(0,26%).
2. El Papanicolaou como diagnóstico concluyente para lesiones de alto grado o en cáncer de cérvix, resulto estar por debajo de la colposcopia y de la tipificación viral en esta investigación, además de demostrar que a veces la valoración clínica del especialista, está muy acertada a pesar de una citología normal. Cabe la pena indicar que realizar un cribado junto con la tipificación viral será uno de los mejores diagnósticos para garantizar una mejor calidad de vida en la mujer y que la vacuna debe abarcar otros tipos de virus, no solo para el 16 y 18, para garantizar la prevención del cáncer de cérvix

10. VALORACIÓN CRÍTICA DE LA INVESTIGACIÓN

En el presente proyecto de investigación se tuvo como limitantes el espacio donde se encuestaba a las paciente que asistían al proceso de control así como el llenado de la encuesta en la cual había que ayudarles a llenarla, otro inconveniente fue en el proceso de extracción del material genético envista que en algunas muestras se tuvo que repetir hasta tres veces el proceso por la poca concentración de ADN que se obtenía.

A pesar de algunas limitaciones que fueron superadas en el transcurso de la investigación se contaba con el personal técnico calificado en la asesoría de cada proceso además de contar la infraestructura y equipos para el desarrollo del mismo.

Con el presente trabajo de investigación se podría proponer a futuro los siguientes temas “Subtipos de Virus de Papiloma Humano en Lesiones Intraepiteliales e Invasoras de Cérvix Uterino en la Población Guayaquileña”, Genotipificación del Virus Papiloma Humano de Alto riesgo en pacientes adolescentes”

BIBLIOGRAFÍA

- Aedo, S., Melo, A., García, P., Guzmán, P., Capurro, I. & Roa, J. (2007). Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP. *rev Méd Chile*,(135), 167-173.
- Angel, A. (2009). Vacunación Frente a VPH en adultos. *Rev Esp Quimioter*, 22(1), 22-25.
- Capogrosso, P., Ventimiglia, E., Mtlloob, R., Colichia M., Serino, A., Castagna, G. *et al.* (2014). Awareness and knowledge of human papillomavirus related diseases are still dramatically insufficient in the era of high coverage vaccination programs. *World Journal Urology*. Recuperadode: http://download.springer.com/static/pdf/486/art%253A10.1007%252Fs00345-014-1379-.pdf?auth66=1410039397_3f8db50b4490a6c15a5c6b9de3fb0907&ext=.pdf
- Castagnino, M. (2000). Electroforesis Capilar. *Bioquimia*. 2(1): 13-32.
- Cortés, E.I., Leal, C.H. (2001). Papiloma virus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis. Revista de Salud Pública y Nutrición*, 2,2.
- De la Fuente Villarreal, D., Guzmán-López, S., Barboza-Quintana, O. & González-Ramírez. (2010). Biología del Virus del papiloma humano y técnicas de Diagnóstico. *Revista de Medicina Universitaria*, 12(49), 231-238.
- Farfán-Vargas, Y., García-Robayo, D., Arias-Murillo, Y., Morales, O. *et al.* (2010). Genotipificación del virus de papiloma humano en mujeres con hallazgo citológico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (Isil) o de significado indeterminado (asc-us). *Rev Colomb Cienc Quím Farm*, 39,42-54.
- Gil, A. (2009). Vacunación Frente a VPH en adultos. *Rev Esp Quimioter*, 22,22-25.
- González, Fuentes. (2006). Diagnostico y Genotificación molecular del virus del Papiloma Humano (VHP) en mujeres ecuatorianas. Inprenta nocion. P. 191-193. Ecuador, Quito.
- Habbous, S., Pang, V., Xua, W., Amir, E. & Liu, G. (2014). Human papillomavirus and host genetic polymorphisms in carcinogenesis: a systematic review and meta-

analysis. Journal of Clinical Virology. Recuperado de: http://ac.els-cdn.com/S1386653214002996/1-s2.0-S1386653214002996-main.pdf?_tid=d1a6afec-347b-11e4-987e00000aab0f6b&acdnat=1409866893_48fda8023ce8ed1cb43d078b6b3da78f

Hernández-Colín, V., Aguilar-Cacho, F., Toraño-Zamudio, V., Sandoval-Jurado, L. & Ceballos-Martínez, Z. (2006). Identificación de mecanismos de transmisión del virus de papiloma humano en mujeres infectadas. *Rev Enferm*, 14(2), 75-79.

Hernández-Girón, C., Smith, J., Lorincz, A., Arreola, E., Lazcano, E., Hernández-Ávila, M & Salmerón, J. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo y factores asociados en embarazos derechohabientes del IMSS en el estado de Morelos. *Salud Pública de México*, 47,423-429.

Jastreboff, A.M & Cyme,t T. (2002). Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* , 78:225-8.

Melo, A., García, P., Capurro, I., Guzmán, P., Brebi, P., Ili, C. *et al.* (2010). Genotipificación del virus papiloma humano en mujeres con adenocarcinoma cervical de la Región de La Araucanía-Chile. *Rev Chil Infect*, 27,297-301.

Molden, T., Nygård, J.F., Kraus, I., Karlsen, F., Nygård, M. *et al* (2005). Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year Follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer*, 114,973-976.

Muñoz-Sandoval, D.C. (2012). Estudio piloto de la incidencia de Papilomavirus en biopsias de cuello uterino en el hospital SOLCA de Quito. Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Mayo de 2012.

Picconi, M., Alonio, L., Garcia, A., Lizano, M., Cervantes, G. *et al.* (2000). Variantes moleculares de virus de papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinoma de cervix. *Medicina (Buenos Aires)*,60,889-894.

Picconi, Maria., Alonio, L., Garcia, A., Lizano, M., Cervantes, G., Distefano, A., Mural, J., Bazan, G. & Teyssie A. (2000). Variantes moleculares de virus de

papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18 en adenocarcinoma de cervix. *Medicina (Buenos Aires)*,(60), 889-894

Sanclemente, G. (2003). Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra virus del papiloma humano. *Gaceta Médica*, 139,173-183.

Vargas-Hernández V. (1996).Virus del papiloma humano. Aspectos epidemiológicos, carcinogénicos, diagnósticos y terapéuticos. *Ginecol Obstet Méx*, 64,411-417.

Vinueza- Burgos, C. (2009). PCR en tiempo real: La nueva Era de la Información genética celular. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 10(2): 1-13

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J. *et al* Peto (1999). papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189,12-19.

Zamudio, A. Z. (2001). Evaluación del papanicolaou y la colposcopia en el diagnóstico de la infección por el virus del papiloma humano. *Rev Fac Med UNAM*, 44(1), 5-7.

ANEXOS

Anexo # 1. Consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA "INSPI"
PROYECTO SENESCYT PIC-12-INH-001 "Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la Prevención del Cáncer Cervical - Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador"
Convenio N° 20120470 GUAYAQUIL - ECUADOR

CONSENTIMIENTO INFORMADO Para Investigación del Virus del Papiloma Humano

Se me ha solicitado participar en un proyecto de investigación que estudia la EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) PARA LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER DE CERVICU-UTERINO EN MUJERES MAYORES DE 30 AÑOS DE LA REGIÓN COSTA DEL ECUADOR, facilitando una muestra citológica que previo a un test de Papanicolaou, presente por lo menos células atípicas para ser incluida en la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH). Los Papilomavirus Humanos están asociados con alteraciones en células del cuello del útero y puede provocar cáncer cervicouterino. Los resultados obtenidos con las técnicas moleculares serán analizados en paralelo con los datos clínicos y epidemiológicos de las pacientes estudiadas para determinar las relaciones entre los hallazgos virológicos y las variables clínicas y epidemiológicas analizadas en la población estudiada, y se extrapolación a la comunidad femenina en general.

YO ENTiendo QUE:

- A) No existen riesgos en este procedimiento de toma de muestra de hisopado cervicouterino.
- B) Los posibles beneficios que tendré en este estudio son: Se podrá establecer un mejor diagnóstico de la enfermedad lo que permitirá un seguimiento adecuado y se mejorará la calidad de vida de pacientes infectadas por VPH con lesiones pre-malignas ya que se focalizará el tratamiento invasivo solamente a las mujeres con lesiones malignas.
- C) Cualquier pregunta que yo quiera hacer en relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por: Ac. César Bedoya Píloso MSc, Director del Proyecto, Dr. Carlos Rosquera Martínez, Coordinador de Investigación y Diagnóstico Microbiológico del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y Manuel González Jefe del Subproceso de Virología del INSPI.
- D) Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelada y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por ley.
- F) Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado u obligado.

Fecha: día _____ mes _____ año 201 _____

Nombre y Apellidos del Paciente

Firma _____

JULIAN CORONEL 905 Y ESMERALDAS
CASILLA 3961 PAGINA WEB www.inh.gub.ec
E-MAIL: investigacionydoc@inh.gub.ec
TELE. (593) 4 – 2282281 EXT. 232

Anexo # 2. Encuesta

Ficha de paciente para la investigación de Papiloma Virus Humano

Fecha de toma de muestra: _____
Tipo de Muestra _____
Muestra tomada por _____
Procedencia _____

I- DATOS PERSONALES.

Nombre y Apellidos: _____
Fecha de nacimiento: _____ Edad: _____ Número de HC: _____
CI: _____ Dirección: _____
Centro de Trabajo: _____ Teléfono: _____

II-ULTIMO GRADO DE ESCOLARIDAD ALCANZADO.

Elemental ___ Primario ___ Secundaria ___ Pre o tecnológico ___ Universitario ___

III-SITUACION LABORAL.

Ama de casa ___ Estudiante ___ Obrera ___ Técnica ___ Profesional ___ privado o informal ___

IV-ESTADO CIVIL.

Soltera ___ Casada ___ Viuda ___ Divorciada ___

V-HISTORIA ANTICONCEPTIVA.

a: (actual)

DIU ___ Progesteron +Estradiol ___ P/C ___ biorritmo ___ Tiempo de uso _____

b: (anterior a la actual)

DIU ___ P+E ___ F ___ biorritmo ___ Tiempo de uso _____

Usa protección al tener relaciones sexuales Si ___ NO ___

VI-HISTORIA OBSTÉTRICA.

Edad de la primera menstruación _____
Última menstruación (fecha) _____
Trastornos Menstruales ___ Metrorragia ___ Leucorrea ___
Menopausia ___ Espontánea ___
Quirúrgica ___ Total ___
Parcial ___
Edad de inicio de las primeras relaciones sexuales _____
Embarazos ___ Primer parto ___ Total ___ Abortos Espontáneos ___
Normales ___ Provocados ___
Patológicos ___
Número de parejas en los últimos dos años _____

VII-HISTORIA GINECOLÓGICA.

a) Antecedentes de enfermedades ginecológicas de naturaleza infecciosa:
Condiloma ___ Gonorrea ___ Monilias ___ Sífilis ___ Trichomonas ___ Herpes Genital ___
Herpes Oral ___
Otras _____

b) Antecedentes de prueba citológica alterada: Si ___ No ___

c) Antecedentes de cirugía cervical: Si ___ No ___

VIII-HABITOS TÓXICOS (en los últimos 10 años): a) Cigarró ___ b) Alcohol ___
c) Otros _____

IX-RESULTADOS:

Prueba citológica _____
Colposcopia _____
Biopsia _____
PVH/PCR _____

Anexo # 3. Protocolo de toma de muestra, SOLCA

1. Alistar materiales a utilizar, cepillo cervicouterino, medio de transporte COBAS de ROCHE, especulo esterilizado.
2. Colocar a la paciente en posición para la respectiva toma de muestra.
3. Introducir el especulo con mucho cuidado con el objetivo de poder visualizar el cuello uterino
4. Con mucho cuidado tomar una pequeña muestra introduciendo el cepillo en el cuello uterino haciendo movimientos circulares con el objetivo de tomar la mayor cantidad de células posible.
5. Colocar el cepillo en los medios de transporte ***CELL COLLECTION MEDIO COBAS*** de la casa comercial ROCHE.
6. Mantener la muestra a 20 °C.

Anexo # 4. Protocolo de extracción del material genético, mediante el *kit*

QuiaGen.

1. Colocar la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL y adicionar 180 uL de buffer ATL.
2. Incubar a 85 °C por 10 min.
3. Centrifugar rápidamente para bajar las gotas que estuvieran en la tapa y las paredes del tubo.
4. Adicionar 10 uL de proteinasa K, mezclar vorteando.
5. Incubar a 56 °C por 1 hora.
6. Centrifugar rápidamente para bajar las gotas que estuvieran en la tapa y las paredes del tubo.
7. Adicionar 200 uL de buffer AL (Tampón de lisis), mixturar vorteando (un precipitado blanco puede aparecer, más que se disolverá durante la lisis).
8. Centrifugar rápidamente para bajar las gotas que estuvieran en la tapa y las paredes del tubo.
9. Adicionar 200 uL de etanol 100% a la muestra y mezclar vorteando.
10. Centrifugar rápidamente para bajar las gotas que estuvieran en la tapa y las paredes del tubo.
11. Cuidadosamente colocar el lisado dentro de una columna previamente colocada en un tubo colector de 20 mL cierre la tapa del tubo.
12. Centrifugar a 8000 RPM por 1 minuto.
13. Colocar la columna en un nuevo tubo recolector de 2 mL y descartar el anterior con el filtrado.
14. Abra el tubo con la columna y adicione 500uL de AW1 buffer. Cierre el tubo y centrifugue a 8000 RPM por 1 min.

15. Colocar la columna en un nuevo tubo recolector de 2 ml y descartar el anterior con el filtrado
16. Abra el tubo con la columna y adicione 500 uL de AW2 buffer. Cierre el tubo y centrifugar a 14000 RPM por 3 minutos.
17. Se recomienda colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 1 minutos para eliminar todo el líquido de la columna.
18. Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL y descartar el anterior con el filtrado.
19. Abra un tubo con la columna y adiciones 100 uL de AE buffer (tampón de elución).
20. Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 8000 RPM por 1 min para eluir el DNA de la columna.
21. El DNA ahora es extraido y debe ser almacenado a -20 °C.
22. El volumen de ADN usado para hacer la reacción de PCR no debe pasar de 10% y será para un volumen de 50 uL de PCR, usar 5 uL de ADN, no mas.

Anexo # 5. Imagen de extracción del material genético



Anexo # 6. Protocolo de amplificación

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

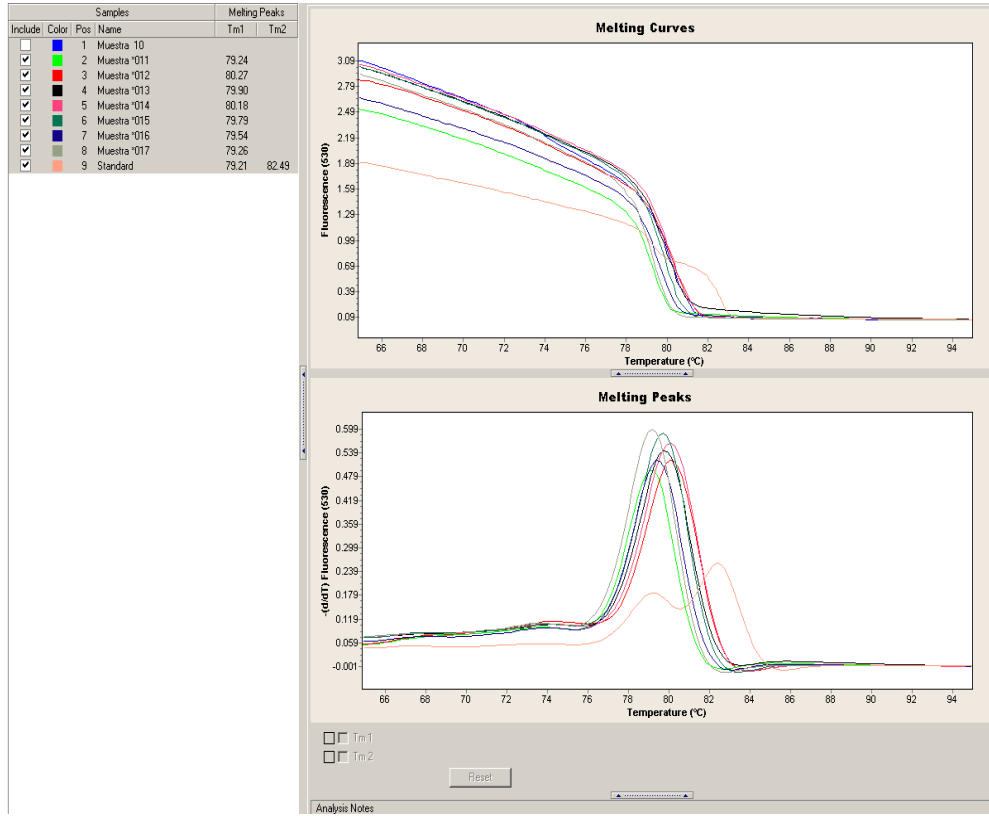
1. Sobre una cubeta con hielo picado ó cooller colocar un tubo eppendorf estéril para preparar la master mix o mezcla maestra para PCR, usando la hoja especialmente diseñada para el objeto.
2. Todos los reactivos deben ser sacados del congelador poco tiempo antes de hacer la mezcla y deberán ser mantenidos sobre hielo picado antes y después de ser usados. Al descongelarlos se debe cuidar de que todo el reactivo se disuelva completamente.
3. Para la adición de cada reactivo se deben utilizar puntas de pipeta nuevas y estériles y la preparación de la mezcla se debe realizar con mascarilla y guantes.
4. Evitar tocar el extremo de las puntas a usarse con cualquier material, el pelo, la piel, etc.
5. La cantidad de master mix a preparar debe ser calculada según el número de tubos de reacción.

6. MASTER MIX (Volumen final por tubo de reacción = 25 microlitros)

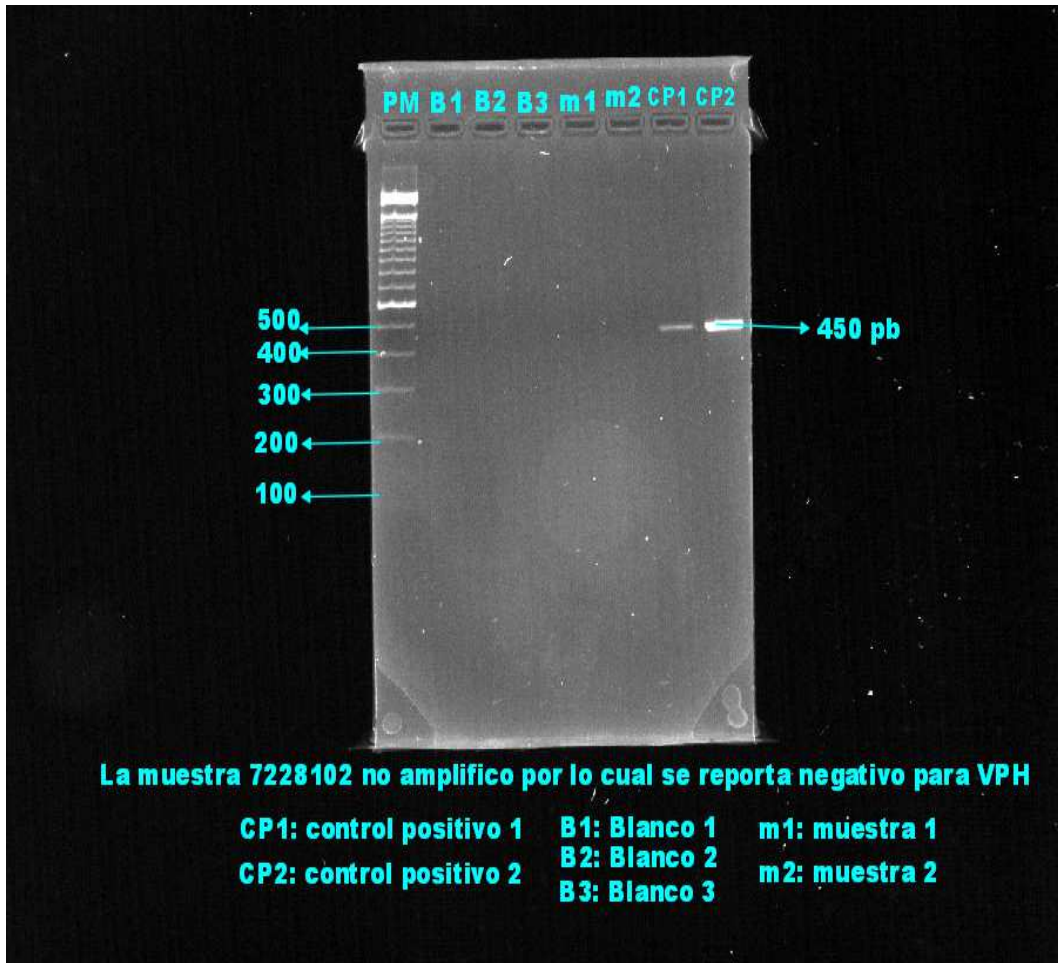
Componentes del PCR					
M-MIX	Ci	Vi	Cf	Vf	# R
H2O bd					
Buffer					
MgCl					
DNTPs					
Primers (x2)					
Taq Polimerasa					
AND					

7. Colocar un volumen igual en microlitros del master mix en cada tubo de reacción (tubos eppendorf 0,2 ml).
8. Llevar los tubos con el cooller al área de extracción de ADN y añadir a cada uno 1 ó 2 microlitros del ADN extraído.
9. Llevar los tubos al área de PCR, para su amplificación en el programa correspondiente.

Anexo # 7. Imagen del proceso de amplificación mediante q-PCR



Anexo # 8. Imagen de los productos amplificados mediante PCR convencional



Anexo # 9. Bases de datos

COD	GENOTIPO	CO-INFECCIÓN	CITOLOGICO	BIOPSIA	COLPOSCOPIA	ALTO RIESGO	CANCER DE CERVIX
1		NO SE ENCUENTRA ADN VIR	0	1	0	0	0
2	58	0	1	1	1	1	0
3	33/31	1	0	0	1	0	0
4	No Detectable	0	0	1	0	0	1
5	16	0				0	0
6	16/18/31/52/53/56	1	1	1	0	0	1
7	16	0	0	1	0	0	1
8	97/18	1	0	0	0	0	0
9	58	0	0	1	0	0	1
10	No Detectable	0				1	0
11	16	0	0	1	0	1	0
12	16	0	1	1	0	1	0
13	No Detectable	0	1	0	0	0	0
14	58	0	0	1	0	1	0
15	70	0	0	1	0	1	0
16	58	0	0	1	0	1	0
17	16/18/58	1	0	0	1	0	0
18	58	0	1	0	1	0	1
19	16	0	0	1	0	0	1
20	16	0	1	1	1	0	1
21	16	0	0	1	0	0	1
22	18	0	1	1	0	1	0
23	53	0	0	0	0	0	0
24	53	0	0	0	0	0	0
25	16	0	0	1	0	0	1
26	16	0	1	0	1	0	1
27	16	0	0	1	0	1	0
28	16	0	0	0	1	1	0
29	16	0	0	1	0	1	0
30	No Detectable	0	0	1	1	0	1
31	No Detectable	0	0	1	0	0	1
32	No Detectable	0	0	0	1	0	0
33	58	0	0	1	1	1	0
34	No Detectable	0	1	0	1	0	0
35	16	0	0	1	0	0	1
36	16	0	0	1	1	0	0
37	58	0	0	1	1	0	1
38	No Detectable	0	0	1	1	1	0
39	No Detectable	0	0	1	1	1	0
40	16	0	0	1	0	1	0
41	58	0	0	1	1	0	1
42	16	0	0	1	1	1	0
43	16	0	0	1	1	0	1
44	16	0				0	1
45	16	0	0	1	1	1	0
46	58	0				0	0
47	58	0	0	1	1	0	0
48	58	0	0	1	1	0	1
49	58	0	0	1	1	1	0
50	16	0	0	1	0	0	1
51	No Detectable	0	0	1	0	1	0
52	No Detectable	0	0	1	1	1	0
53	16	0	0	1	0	0	1
54	No Detectable	0	0	1	1	0	1
55	No Detectable	0	1	1	1	1	0
56	No Detectable	0				1	0
57		0	0	1	0	0	0
58	33	0	0	1	1	0	0
59	16	0	1	1	1	0	1
60	58	0	0	1	0	0	1
61	No Detectable	0	0	0	1	0	0
62	52	0	0	1	1	1	0
63	16	0	0	1	1	1	0
64	16	0	0	1	1	1	0
65	No Detectable	0	0	1	1	0	0
66	16	0	1	1	1	1	0
67	No Detectable	0	0	1	1	1	0
68	58	0	0	1	1	0	1
69	No Detectable	0	0	1	1	0	1
70	No Detectable	0	0	1	1	0	1
71	No Detectable	0	0	1	1	1	0
72	58	0	0	1	1	0	1
73	58	0	1	1	1	0	1
74	No Detectable	0	1	1	1	0	1
75	58	0	1	1	1	1	0
76	31	0	1	1	0	0	1

77	86	0	0	0	1	0	0
78	No Detectable	0				0	0
79	16	0	0	1	1	0	1
80	16	0	0	0	0	0	0
81	18	0	0	1	1	0	1
82	31	0	1	1	1	0	0
83	72/59	1	0	0	1	0	0
84	16	0	0	1	1	0	1
85	31	0	0	1	1	1	0
86	31	0	0	1	1	1	0
87	6	0	1	1	1	0	1
88	No Detectable	0	0	1	1	1	0
89	16	0	0	1	1	0	1
90	69	0	0	1	1	0	0
91	58	0	0	1	1	0	1
92	16	0	1	1	1	0	1
93	16	0	0	1	0	0	1
94	58	0				0	0
95	82/42	1	0	1	0	0	1
96	No Detectable	0	0	1	1	0	1
97	16	0	1	1	1	0	1
98	58	0	0	1	1	1	0
99	58	0	1	0	0	0	0
100	53	0	0	0	0	0	0
101	No Detectable	0	1	1	1	0	1
102	73/34/64/33/42/68	1	1	1	0	0	0
103	58	0	0	1	0	0	1
104	16	0	0	1	0	0	1
105	58	0	0	0	0	0	0
106	No Detectable	0	0	1	0	0	1
107	16	0	0	1	1	0	1
108	58	0	0	1	0	0	0
109	52	0	0	1	1	0	1
110	52	0	0	1	1	0	1
111	16	0	0	1	1	0	1
112	53	0	1	1	0	0	1
113	no informe	0				0	0
114	58	0	1	1	0	1	0
115	16	0	0	1	1	0	1
116	16	0	0	1	1	0	1
117	No Detectable	0	0	1	1	0	1
118	31	0	1	1	1	0	1
119	31	0	0	1	1	1	0
120	no informe	0	0	1	1	0	0
121	no detectable	0	0	1	1	1	0
122	No Detectable	0	0	1	1	0	1
123	16	0	0	1	1	1	0
124	16	0	0	0	1	0	0
125	16	0	0	1	1	1	0
126	No Detectable	0	0	1	1	0	1
127	No Detectable	0	1	0	1	0	0
128	58	0	0	1	1	0	1
129	No Detectable	0	0	0	0	0	0
130	No Detectable	0	0	1	1	0	1
131	No Detectable	0	1	1	1	0	1
132	No Detectable	0	1	0	0	0	0
133	No Detectable	0	0	1	1	1	0
134	No Detectable	0	1	1	1	1	0
135	66	0	1	1	1	0	1
136	no detectable	0	1	1	1	1	0
137	18	0	1	1	1	1	0
138	No Detectable	0	1	0	0	0	0
139	no informe	0	1	0	1	0	0
140	no informe	0	0	0	0	0	0
141	No Detectable	0	0	0	0	0	0
142	no informe	0	0	0	1	0	0
143	no detectable	0	0	0	1	1	0
144	16	0	0	1	0	1	0
145	no detectable	0	0	1	0	1	0
146	no detectable	0	0	0	0	1	0
147	no informe	0	0	0	0	0	0
148	16	0	0	1	1	1	0
149	no detectable	0	0	1	1	1	0
150	53	0	0	0	0	0	0
151	no detectable	0	0	1	0	1	0
152	no detectable	0	0	1	0	1	0
153	no detectable	0	1	1	0	1	0
154	56	0	0	1	1	1	0
155	no detectable	0	0	1	1	1	0
156	no informe	0	0	0	0	0	0

157	no informe	0	1	1	1	0	0
158	16	0	0	1	0	1	0
159	16	0	0	1	1	0	1
160	no detectable	0	0	1	1	1	0
161	18	0	1	1	1	0	1
162	no detectable	0	0	1	1	1	0
163	no detectable	0	0	1	1	1	0
164	no detectable	0	0	1	1	1	0
165	No Detectable	0	0	0	0	0	0
166	11	0	0	0	1	0	0
167	no informe	0	0	0	0	0	0
168	6	0	0	1	1	0	0
169	no detectable	0	0	1	1	1	0
170	no detectable	0	0	1	1	1	0
171	no detectable	0	0	1	1	1	0
172	no detectable	0	0	1	1	1	0
173	35	0	1	1	1	1	0
174	16	0	1	1	1	0	1
175	no detectable	0	0	1	1	1	0

Anexo #10. Hoja de resultados

LABORATORIO DE VIROLOGIA -					
EXAMEN DE: CEPILLADO CERVICO-VAGINAL. PACIENTE: SANCHEZ RAMIREZ JESSICA SOLICITADO POR: H E SOTOMAYOR					
MUESTRA	CÓDIGO	EDAD	GENERO	INGRESO	RESULTADO
14170	462556	36 AÑOS	FEMENINO	18/08/2014	18/11/2014

RESULTADO

Prueba Realizada: Deteccion
de Virus del Papiloma Humano (VPH)

Técnicas usadas:

Deteccion universal por PCR X
Genotipificación por electroforesis capilar X
Genotipificación por PCR Tiempo Real

Resultado

VPH: DETECTABLE

Genotipo: VPH 16

Observaciones:

