

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO**

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de **Licenciada en Ciencias
de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**“VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO IDENTIFICADOS POR BIOLOGÍA
MOLECULAR. HOSPITAL ANDINO. RIOBAMBA. MAYO 2017 – JUNIO
2018”**

AUTORA:

Cabezas Chávez Tania Brigitte

TUTORA:

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

Riobamba - Ecuador

Año 2018

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: **“VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO IDENTIFICADOS POR BIOLOGÍA MOLECULAR. HOSPITAL ANDINO. RIOBAMBA. MAYO 2017 – JUNIO 2018”** presentado por Tania Brigitte Cabezas Chávez y dirigido por: MgS. Yisela Carolina Ramos Campi, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

MgS. Mercedes Balladares
Presidente del Tribunal



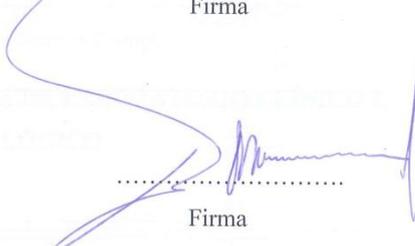
.....
Firma

Lic. Eliana Martínez
Miembro del Tribunal



.....
Firma

MgS. Paul Parra
Miembro del Tribunal



.....
Firma

AUTORIA DE LA INVESTIGACION

DECLARACIÓN DEL TUTOR

Yo, Yisela Carolina Ramos Campi. Docente de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del proyecto de investigación con el Tema: **“VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO IDENTIFICADOS POR BIOLOGÍA MOLECULAR. HOSPITAL ANDINO. RIOBAMBA. MAYO 2017 – JUNIO 2018”**, propuesto por la Srta. Tania Brigitte Cabezas Chávez egresada de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad de ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. En todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada hacer uso del presente para los trámites respectivos.

Tania Brigitte Cabezas Chávez



.....

MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

**DOCENTE TUTORA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN:

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a: Cabezas Chávez Tania Brigitte y Tutora MgS. Yisela Carolina Ramos Campi; y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de superarme y salir adelante, brindándome salud y sabiduría para alcanzar las metas trazadas, y de manera especial a mis padres por ser el pilar fundamental en mi educación, por su apoyo, amor y comprensión.

Agradezco a mi valiosa institución la Universidad Nacional de Chimborazo, mis maestros, quienes me han brindado la oportunidad de formarme en mi carrera profesional. A mi tutora de tesis MgS. Yisela Ramos por su paciencia y motivación en este trabajo de investigación.



CABEZAS CHÁVEZ TANIA

Tania Brigitte Cabezas Chávez

CI: 060449735-4

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de superarme y salir adelante brindándome salud y sabiduría para cumplir las metas trazadas, y de manera especial a mis padres por ser el pilar fundamental en mi educación, por su apoyo, amor y comprensión.

Agradezco a mi valiosa Institución la Universidad Nacional de Chimborazo, mis maestros, quienes me han brindado la oportunidad de formarme en mi carrera profesional. A mi tutora de tesis MgS. Yisela Ramos por su paciencia y motivación en este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico a mi esposo Fernando quien confió en mis capacidades, esfuerzo y sacrificio, siendo mi fuente de inspiración y apoyo incondicional para alcanzar este anhelado título, con mucho amor y cariño a mi hijo Jeremy quien es el motivo y razón de mi existencia

RESUMEN

El virus del papiloma humano (HPV) es el causante de Cáncer de cuello uterino en mujeres, siendo este la segunda causa de muerte en el Ecuador. El HPV es la infección por transmisión sexual más frecuente en el mundo y se caracteriza por ser precedido por un conjunto de lesiones cervicales intraepiteliales, las mismas que de no ser tratadas a tiempo evolucionan en Cáncer de células escamosas. En el presente trabajo de investigación se realizó un estudio descriptivo, cuali-cuantitativo de corte transversal, no experimental, cuyo objetivo fue determinar la presencia del virus del papiloma humano en el área de Laboratorio Clínico del Hospital Andino de Riobamba durante el periodo mayo 2017 – junio 2018. Se trabajó con 53 resultados de muestras con diferentes lesiones displásicas de citología convencional, con un diagnóstico presuntivo de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS) 98% y lesión intraepitelial de alto grado 2%. Al obtener los resultados de Biología Molecular mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, se determinó que, el 22,64% de los resultados obtenidos corresponden a 12 mujeres detectadas con HPV de alto riesgo oncogénico y el 77,36% de los resultados obtenidos corresponden a 41 mujeres detectadas con HPV de bajo riesgo. Las pruebas moleculares han sido exitosas en el diagnóstico de Cáncer de Cuello Uterino, en la cual la prueba de PCR en tiempo real es muy utilizada al momento del estudio de cepas de HPV, con una especificidad y sensibilidad más alta que otras pruebas como captura Híbrida.

Palabras claves: Virus del papiloma humano, Cáncer de cuello uterino, Lesiones intraepiteliales, PCR.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is the cause of cervical cancer in women, this being the second cause of death in Ecuador. HPV is the most frequent sexually transmitted infection in the world and is characterized by being preceded by a set of cervical intraepithelial lesions, which, if not treated in time, evolve in squamous cell cancer. In the present research work, a descriptive, quantitative, cross-sectional non-experimental study was carried out, whose objective was to determine the presence of human papillomavirus in the Clinical Laboratory area of the Hospital Andino de Riobamba during the period May 2017 - June 2018. We worked with 53 results of samples with different dysplastic lesions of conventional cytology, with a presumptive diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) 98% and low grade 2% intraepithelial lesion. When obtaining the results of Molecular Biology using the technique of real-time polymerase chain reaction (PCR), it was determined that 22.64% of the results obtained correspond to 12 women detected with high-risk oncogenic HPV and 77.36% of the results obtained correspond to 41 women detected with low-risk HPV. Molecular tests have been successful in the diagnosis of Cervical Cancer, in which the real-time PCR test is widely used at the time of the study of HPV strains, with a higher specificity and sensitivity than other tests like Hybrid Capture.

Keywords: Human papillomavirus, cervical cancer, intraepithelial lesions, PCR.



SIGNATURE

Reviewed by: Maldonado, Ana

Language Center Teacher



INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMATICA.....	5
ÚTERO.....	5
CUELLO UTERINO.....	5
Exocérvix.....	5
Canal endocervical o Endocérvix.....	6
PATOLOGÍA.....	6
CÁNCER DE CUELLO UTERINO.....	6
LESIONES HISTOLÓGICAS CAUSADAS POR EL VIRUS.....	7
CLASIFICACIÓN CITOLÓGICA DE BETHESDA.....	8
Factores de riesgo de cáncer.....	8
Factores de riesgo de infección por el virus.....	9
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV).....	9
PROTEÍNAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y FUNCIONES ASOCIADAS.....	9
CICLO REPLICATIVO.....	10
PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN.....	12
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	12
Obtención de la muestra.....	13
OTRAS PRUEBAS.....	15
Prueba de Papanicolaou.....	15
Colposcopia.....	15
METODOLOGÍA.....	16
TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	16
DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA.....	16
TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	16

PROCEDIMIENTO.....	17
ANÁLISIS DE DATOS	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Relación entre PCR real y convencional.....	14
Tabla N°2. Presencia del HPV de alto y bajo riesgo en el Hospital Andino	18
Tabla N°3. HPV de alto riesgo relacionado con edades	19
Tabla N°4. HPV de bajo riesgo relacionado con edades	20
Tabla N°5. Diagnostico presuntivo de las pacientes.....	21
Tabla N°6. Resultados positivos para LSIL según PCR en Tiempo Real.	22
Tabla N°7. Resultados positivos para HSIL según PCR en Tiempo Real.....	23

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano es un virus de doble banda de ADN circular, no encapsulado, perteneciente a la familia Papovaviridae, incluida en el género Papilomavirus. El virus del papiloma humano es una causa necesaria, pero no suficiente, para desarrollar cáncer de cuello uterino. Muchas mujeres se infectan con el virus del papiloma humano alguna vez en su vida, usualmente al inicio de la actividad sexual. La mayoría de infecciones se resolverán espontáneamente desde los 6 hasta los 24 meses, tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH⁽¹⁾.

La transmisión del VPH se da generalmente por el contacto directo con la piel de genitales infectados, las membranas, mucosas, y a través del coito y del sexo oral, permitiendo así su transferencia entre las células epiteliales. Entre los factores que aumentan el riesgo de infectarse con una enfermedad de transmisión sexual como lo es el papilomavirus encontramos, edad de inicio de vida sexual, mantener contacto sexual sin protección con individuos de alto riesgo, tener múltiples parejas sexuales⁽²⁾.

Los papilomavirus han cohabitado con la especie humana hace muchos años, sufriendo pocos cambios en su composición genómica. Basado en el análisis de secuencia de DNA, hasta el momento se conocen más de 100 tipos de papilomas. Los VPH tipo 16 y 18 son considerados de alto riesgo por estar asociados con la gran mayoría de cáncer de cuello uterino, vagina y ano, además de presentarse también escasos de cáncer de vulva, pene e incluso cavidad bucal, pero con una fracción atribuible considerablemente menor a la del cáncer de cérvix, Los tipos 6 y 11 son considerados de bajo riesgo ya que son causantes de la aparición de verrugas genitales⁽³⁾.

El cáncer del cuello uterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, las cuales progresan a cáncer in situ o un cáncer invasor en donde las células con transformación maligna traspasan la membrana basal⁽¹⁾.

El cuello del útero es el área genital con mayor riesgo para que se produzcan infecciones persistentes por VPH, este mayor riesgo se explica porque en el cuello

uterino existe una zona susceptible a la infección por el VPH llamada la zona de transformación. El cáncer de cuello uterino es una enfermedad en la que se presentan cambios en las células que cubren las paredes del cuello uterino. Estos cambios cuando son precancerosos se conocen como neoplasia intraepitelial cervical (CIN), lesión intraepitelial escamosa (SIL) de bajo y alto grado y displasia con sus tres grados: leve, moderada y severa, luego se presenta el cáncer in situ (si no invade la membrana basal) y el cáncer invasor (cuando atraviesa la membrana basal) ⁽⁴⁾.

El virus del papiloma, es uno de los tipos más comunes de cáncer que afectan a mujeres en el mundo ocupando el cuarto lugar con 266.000 muertes y un número estimado de 528.000 nuevos casos en 2012. El 85% de esas muertes se produjeron en regiones menos desarrolladas, en donde este virus es el causante de casi el 12% de todos los cánceres femeninos. La mayor prevalencia de Virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59, se encuentra en África y América Latina. El numero 16 es el más frecuente en el mundo, excepto Indonesia y Argelia donde el numero 18 es el más común ⁽⁵⁾.

El Cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública a nivel mundial. En los últimos años, la mortalidad por Cáncer de Cuello uterino ha disminuido, principalmente en los países desarrollados gracias al aumento en la disponibilidad de programas de detección oportuna a través del estudio citológico. La incidencia, a su vez, muestra una tendencia al aumento en los años recientes entre mujeres menores de 50 años en Estados Unidos y Europa, lo que podría estar reflejando un aumento de detección por el uso de técnicas diagnósticas ⁽⁶⁾.

En Ecuador el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, solo superada por el cáncer de estómago. La tasa cruda de incidencia del cáncer cervical es de 20 casos por cada 100.000 habitantes, ocupando el segundo puesto en incidencia después del cáncer de mama, con variaciones regionales importantes, así por ejemplo en Quito la incidencia del cáncer del cuello uterino por cada 100.000 habitantes es de 19 y en Loja es aún más alarmante por cada 100.000 habitantes es de 32 ⁽⁷⁾.

La asociación de los resultados de prueba citológica convencional con las técnicas moleculares es de gran importancia ya que los resultados a obtener, demostrarán la presencia de la infección causada por este virus en nuestra población y ayudara para entender de mejor manera la evolución de la infección por HPV en sus diferentes estadios, permitiendo detectar, prevenir e intervenir precozmente en los factores de riesgo que causan la infección. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia del virus mediante la técnica de PCR en tiempo real por lo cual, este estudio beneficiará directamente a la población femenina que acude al Hospital Andino de Riobamba puesto que se generará una base sobre la investigación y permitirá formular nuevos planteamientos y preguntas de investigación. Este proyecto de investigación puede ser de gran interés social, ya que facilita información que ayudará en futuras investigaciones. El impacto social del tema es de vital importancia tomando en cuenta que la población en estudio son mujeres infectadas con VPH y posible Cáncer de Cuello uterino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la presencia del Virus del Papiloma Humano por Biología Molecular en el Hospital Andino de Riobamba periodo mayo 2017 -junio 2018.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar el Virus del Papiloma Humano de alto y bajo riesgo oncogénico mediante resultados obtenidos con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.
- Analizar la calidad del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real utilizado para la determinación del Virus del Papiloma Humano de muestras cérvico uterinas.
- Caracterizar las lesiones según el diagnóstico por la citología convencional con los resultados de las pruebas realizadas para establecer nuevos posibles diagnósticos.

ESTADO DEL ARTE RELACIONADO A LA TEMATICA

ÚTERO

El útero es un órgano muscular en forma de pera, tiene una pared gruesa el cual está ubicado entre la vejiga urinaria y el recto, mide cerca de 7.5 cm de longitud, 5 cm de ancho y 2 cm de grosor y pesa unos 90 gramos. Dividido en dos partes: el cuello uterino o cérvix y el cuerpo. El cuerpo constituye los dos tercios superiores, dispone de dos partes: (Fondo: situado por encima de los orificios de las trompas uterinas e Istmo: longitud aproximada de 1cm justo por encima del cuello uterino)⁽⁸⁾.

CUELLO UTERINO

El cuello uterino es la porción inferior del útero, el cual está delimitado hacia arriba por el istmo y protruye en la vagina. Mide entre 2,5 y 3 cm de longitud y se ubica hacia atrás en forma oblicua⁽⁹⁾.

En el cuello uterino existen dos porciones bien delimitadas: el exocérvix y el canal endocervical⁽⁹⁾.

Exocérvix

La superficie del exocérvix normal tiene la apariencia de una mucosa uniforme lisa, de coloración rosada y brillante, está recubierto por el epitelio escamoso⁽¹⁰⁾.

Este epitelio se divide en tres estratos:

- Estrato basal / parabasal, se encuentra constituido por una sola hilera de células basales que presentan núcleos alargados. Las células parabasales constituyen las dos hileras superiores, más grandes que las parabasales, son células con mayor cantidad de citoplasma. Estas células son las encargadas del crecimiento y la regeneración epitelial⁽¹¹⁾.
- Estrato medio o espinoso, se encuentra formado por células que están madurando, las mismas se caracterizan por el aumento del tamaño en el citoplasma. Su núcleo es redondo con una cromatina finamente granular. Pueden tener glucógeno en el citoplasma y dar una imagen característica de vacuola clara en el citoplasma⁽¹¹⁾.

- Estrato superficial: Este es el compartimento más diferenciado del epitelio. Las células presentan citoplasma abundante y un núcleo picnótico característico. La función de estas células es de protección y evitar de infecciones⁽¹¹⁾.

Canal endocervical o Endocérvix

No siempre se puede observar, en caso de normalidad, su mucosa aparecerá con discreto relieve papilar, rosado, liso, y brillante⁽¹⁰⁾. El mismo está formado por una hilera de células cilíndricas mucíparas las cuales revisten la superficie y las estructuras glandulares.

Las células cilíndricas del endocérvix tiene un núcleo basal con eje perpendicular hacia la membrana basal y citoplasma alto, finamente granular lleno de pequeñas vacuolas mucinosas⁽⁹⁾.

Unión escamocolumnar

En esta parte el epitelio escamoso del exocérvix se une al epitelio cilíndrico mucíparo del endocérvix. Desde el nacimiento, el punto de unión entre el epitelio escamoso y el cilíndrico se denomina unión escamocolumnar original. Durante la infancia y la pubertad el cuello uterino produce su alargamiento y por consiguiente la salida del epitelio mucíparo. Posteriormente el epitelio mucíparo es reemplazado por un epitelio escamoso metaplásico. La unión entre este nuevo epitelio escamoso y el epitelio cilíndrico se llama ahora unión escamocolumnar fisiológica o funcional. La zona entre la unión escamocolumnar original y la funcional se denomina zona de transformación⁽⁹⁾.

Zona de transformación

En esta zona del cuello uterino el epitelio cilíndrico es remplazado o está reemplazándose con el nuevo epitelio escamoso de tipo metaplásico y es el área de todas las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino⁽⁹⁾.

PATOLOGÍA

CÁNCER DE CUELLO UTERINO

El cáncer de cuello uterino inicia como una lesión displásica o intraepitelial cervical, la cual afecta principalmente a la zona de transformación (la unión de los epitelios escamoso y columnar). En algunos casos esta lesión intraepitelial evoluciona de manera

paulatina hasta un carcinoma in situ, con una posibilidad de romper la membrana basal y así invadir el estroma adyacente y convertirse en un carcinoma micro invasor (nivel de invasión menor de 5 mm). En esta etapa puede continuar su infiltración, hasta convertirse en carcinoma invasivo⁽¹²⁾.

El VPH alcanza el cuello uterino mediante transmisión sexual infectando las células basales y parabasales en la unión escamocolumnar de la zona de transformación. La mayoría de lesiones de bajo grado experimentan una regresión y no progresan, especialmente en mujeres jóvenes portadoras de infecciones transitorias. Esto se debe a que los mecanismos de defensa del organismo erradican el virus. Se estima que el 5% de las mujeres infectadas con VPH de alto riesgo contraen infecciones persistentes.

Las lesiones de alto grado, son menos comunes y pueden surgir tanto por una progresión de las displasias de bajo grado, o directamente de la infección persistente por VPH. Algunas de estas lesiones de alto grado progresan a carcinoma invasor⁽¹³⁾.

LESIONES HISTOLÓGICAS CAUSADAS POR EL VIRUS

La infección persistente por VPH puede provocar lesiones precancerosas como: neoplasia intraepitelial cervical (NIC II o NIC III) o adenocarcinoma in situ - AIS. Si las mismas no se tratan, las NIC II y III tienen mayor probabilidad de progresar a cáncer de células escamosas, y el AIS hacia adenocarcinoma. El tiempo entre la infección inicial por VPH y el desarrollo de cáncer cervical promedia los 20 años⁽¹⁴⁾.

Histológicamente se pueden diferenciar por el grado de proliferación del epitelio basaloide, la actividad mitótica, la atipia celular y los cambios coilocíticos existentes en el epitelio. En las lesiones de bajo grado predomina la coilocitosis, que causa la infección por VPH en el epitelio escamoso cervical, la proliferación celular del epitelio basaloide es escasa y las mitosis se encuentran únicamente en la zona basal., En las lesiones de alto grado por el contrario se observa mayor atipia celular, menor cambio coilocítico, la actividad mitótica aumentada con mitosis que alcanzan la superficie epitelial y la proliferación del epitelio basaloide y puede alcanzar la superficie epitelial⁽¹⁴⁾.

CLASIFICACIÓN CITOLÓGICA DE BETHESDA

Resultados e interpretaciones.

- Negativo para lesión intraepitelial o malignidad:
Cuando no existe evidencia celular de neoplasia, aunque existan otros hallazgos no neoplásicos como microorganismos.

Células epiteliales anormales

Células escamosas

- Células escamosas atípicas (ASC).
 - ✓ De significado indeterminado (ASC-US).
 - ✓ Que no pueden excluir lesión escamosa intraepitelial de alto grado (ASC-H).
- Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL).
Incluye infección por VPH / displasia leve / CIN 1.
- Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL).
Incluye displasia moderada y severa / CIN 2 y CIN 3 / carcinoma escamoso in situ. Con características sospechosas de invasión. (Si se sospecha invasión).
- Carcinoma escamoso.

Células glandulares

- Células glandulares atípicas (AGC)
Células endocervicales, células endometriales o células glandulares sin especificar origen.
- Células glandulares atípicas, posiblemente neoplásicas.
- Adenocarcinoma endocervical in situ (AIS).
- Adenocarcinoma endocervical, endometrial, extrauterino o sin especificar⁽¹⁵⁾.

Factores de riesgo de cáncer

El consumo de tabaco y de alcohol, la mala alimentación y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en el mundo, y lo son también de otras enfermedades no transmisibles⁽¹⁶⁾.

Factores de riesgo de infección por el virus

- Coito sin protección, con varias parejas o coito con un varón que tiene varias parejas sexuales.
- Inicio temprano de la actividad sexual.
- Uso prolongado de anticonceptivos hormonales.
- Varios embarazos.
- Otras infecciones genitales de transmisión sexual, como Chlamydia o el virus herpes simplex 2.

Entre los cofactores o factores de riesgo para la persistencia viral y el desarrollo de lesiones intraepiteliales o invasoras, podemos mencionar el hábito de fumar, la dieta, el uso de anticonceptivos orales por periodos prolongados, estados de inmunosupresión entre los que se destacan la infección por HIV o el uso de drogas ilícitas. Si bien el preservativo puede prevenir la infección, no lo hace en el 100 %, debido a que es un virus mucoso y cutáneo trópico que puede alojarse en zonas del tracto genital no protegidas por el preservativo ⁽¹⁷⁾.

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV)

El Virus del Papiloma Humano pertenecen a la familia Papovaviridae, es un grupo de virus de ADN de doble banda, no poseen envoltura, tiene una estructura icosaédrica con un diámetro aproximado de 52-55 nm. Las partículas virales están formadas por una cápsida proteica, en la cual el 95% pertenecen a la proteína L1 y un 5% pertenece a la proteína L2. Hacia el interior de la cápsida se encuentra un ADN circular de doble cadena con aproximadamente 8000 pares de bases, constituido también por ocho genes y una región regulatoria no codificante, la cual contiene sitios de unión necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación ⁽¹⁸⁾.

PROTEÍNAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y FUNCIONES ASOCIADAS

No estructurales

- **E1** Es esencial para la replicación y la transcripción
- **E2** Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación

- **E4** Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones
- **E5** Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria
- **E6** Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis; interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa
- **E7** Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB; incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria

Estructurales

- **L1** Proteína principal de la cápside. Reconoce receptores sobre la célula hospedera. Es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes
- **L2** Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones⁽¹⁹⁾.

CICLO REPLICATIVO

El ciclo replicativo de los papilomavirus se divide en dos etapas, temprana y tardía. Estas etapas están ligadas al estado de diferenciación de la célula epitelial presente en el tejido del ciclo vital del HPV⁽²⁰⁾.

La E1 y la E2 son de las primeras proteínas en expresarse, lo cual genera un control en el número de copias del genoma viral episomal (no integrado al genoma celular). Esas proteínas se mantienen entre 20 y 100 copias por célula. Ambas forman un complejo para reclutar la maquinaria de polimerización celular y factores para la replicación del genoma. En la capa suprabasal la expresión de los genes E1, E2, E5, E6 y E7 contribuye al mantenimiento del genoma viral e induce la proliferación celular, incrementando el número de células susceptibles de ser infectadas, lo cual redundará en una mayor producción viral. En las zonas donde se encuentran las células más diferenciadas se

mantiene la expresión de los genes E1, E2, E6 y E7, además se comienza a expresar el gen E4, que tiene la función de amplificar la replicación del genoma viral, incrementando significativamente el número de copias del genoma, mientras que se activa la transcripción de los genes tardíos L1 y L2, involucrados en el ensamble y en la salida de los nuevos viriones⁽²⁰⁾.

Las funciones tardías de los papilomavirus, tales como la síntesis de ADN viral, de las proteínas de la cápside, así como el ensamble de los viriones ocurren exclusivamente en queratinocitos diferenciados. La regulación transcripcional de los genes tardíos es dirigida por un promotor específico que solo responde en queratinocitos diferenciados. Poco es lo que se sabe del proceso de ensamble y liberación de las partículas virales; sin embargo, la encapsidación del genoma es asistida por L2 y es facilitada por E2. Las partículas se han observado en la capa granular del epitelio, pero no en estratos inferiores. Se asume que el virus no es citolítico y la liberación de las partículas virales no ocurre antes de la capa cornificada del epitelio queratinizado⁽¹⁴⁾.

En los serotipos de VPH 16 y 18, E2 reprime el promotor a través de la cual se transcriben genes E6 y E7. A causa de la integración los genes E6 y E7 se expresan como positivo en cáncer de HPV. Posiblemente los únicos factores virales necesarios para la inmortalidad de células epiteliales genitales humanas son los E6 y E7. Además, estas oncoproteínas forman complejos con otras proteínas reguladoras de las células (P53 y pRB) producen degradación rápida de la P53 e impiden, su función normal en respuesta al daño del ADN inducido por otros factores⁽¹²⁾.

TIPOS DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Existen diferentes tipos de HPV que pueden producir el papiloma oral, papiloma laríngeo y algunos otros el papiloma en la conjuntiva y nasal, aunque los de mayor importancia epidemiológica son aquellos que ocasionan verrugas en el cuello del útero, vagina, uretra, pene y ano. Asimismo, aquellos que se encuentran íntimamente relacionados al desarrollo del cáncer Cervicouterino⁽²¹⁾.

- **HPV de alto riesgo**

Encontramos a los HPV:16-18-31-33-35-39-45-51-52-53-56-58-59-66-68-73, son considerados de alto riesgo oncogénico; entre ellos, los más comunes son los

HPV 16 y 18, responsables de aproximadamente el 70% de los casos de cáncer Cervicouterino en todo el mundo, están relacionados con las L-SIL y las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (H-SIL), con carcinomas escamosos invasivos (cérvix, vagina, vulva, ano, pene, etc.) y con adenocarcinomas. Estas lesiones constituyen el espectro de una misma enfermedad pudiendo evolucionar de más bajo a más alto grado de alteración celular, desde formas de L-SIL hasta carcinoma in situ (CIS) y, finalmente, cáncer invasivo ⁽²²⁾.

- **HPV de bajo riesgo**

Encontramos a los HPV: 6- 11- 40-42- 43- 44- 54-55-57- 61-62-64-69- 70-71- 72- 81-83-84), son los responsables del desarrollo de los condilomas acuminados o también llamado cresta de gallo y de las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (L- SIL), que son considerados benignos con mínimo riesgo de progresión maligna. En ocasiones, este HPV puede también provocar cambios visibles en el área genital, denominándolos verrugas genitales. Las verrugas genitales son crecimientos anormales del tejido de la piel en la zona genital de mujeres y hombres, no causan dolor. Pueden ser planas o elevadas, grandes o pequeñas, simples o múltiples. No se conoce por qué el HPV de bajo riesgo causa verrugas genitales en algunos casos, y en otros no, que pueden terminar en CA ⁽²²⁾.

PRUEBAS PARA IDENTIFICACIÓN

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La PCR en tiempo real se basa en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en la década de los 80, que permite detectar ADN a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces ⁽²³⁾.

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la

secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, 1,000 veces más sensibles que la hibridación por Dot blot² y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN⁽²³⁾.

La amplificación de genes mediante PCR permite obtener millones de copias a partir de un fragmento de ADN particular. Se han diseñado diferentes conjuntos de primers o cebos, que en su mayoría han sido dirigidos hacia la región L1 y que permiten diferenciar, mediante sondas específicas, los tipos más frecuentes de VPH de alto, intermedio y bajo riesgo efectuando una hibridación en placa de los productos biotinilados previamente amplificados por PCR. Esta técnica es muy sensible, con un nivel de detección hasta de una copia viral. Sin embargo, debido a su alta sensibilidad, este método es muy susceptible a contaminación

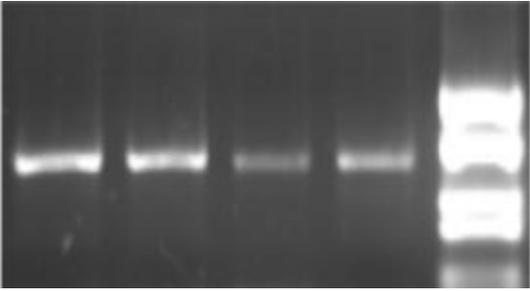
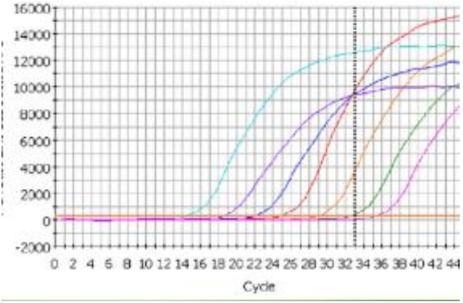
La prueba de VPH ADN se usa con más frecuencia en dos situaciones:

- La prueba genética del VPH se puede usar en combinación con la prueba de Papanicolaou para detectar el cáncer de cuello uterino. La Sociedad Americana Contra El Cáncer recomienda esta combinación para las mujeres a partir de los 30 años de edad. La prueba de VPH ADN no se recomienda para detectar cáncer de cuello uterino en mujeres menores de 30. Esto se debe a que las mujeres de 20 a 29 años que están sexualmente activas tienen una gran probabilidad de contraer infecciones por VPH que desaparecerán por sí solas. Para estas mujeres más jóvenes, los resultados de esta prueba no son tan importantes y pueden causar más confusión.
- La prueba de VPH ADN también se usa en mujeres que obtuvieron resultados ligeramente anormales en la prueba de Papanicolaou (ASC-US) con el fin de determinar si es necesario que se hagan más pruebas o recibir tratamiento⁽²⁴⁾.

Obtención de la muestra

Citología con base líquida: Es una variación de la citología en la que la toma de la muestra es parecida a la del Papanicolaou. En ésta se utiliza un cepillo cervical y la muestra extraída se introduce en un frasco con un medio de transporte líquido para su envío al laboratorio y, posteriormente, procesar la muestra⁽²⁵⁾.

Tabla N°1. Relación entre PCR en tiempo real y convencional

PCR Convencional	PCR Tiempo Real
<p>Amplificación y detección de productos en 2 etapas separadas: La retro transcripción y amplificación ocurren separadamente. Ventajas: Permite corroborar la eficiencia de la retro transcripción y mayor sensibilidad. Desventajas: Mayor probabilidad de contaminación de la muestra.</p>	<p>Amplificación y detección de productos en una misma etapa: La retro transcripción y amplificación ocurren en el mismo tubo. Ventajas: Se minimizan las variaciones experimentales y la posibilidad de contaminaciones. Desventajas: El ADNc generado sirve solo para una amplificación y se ha reportado que es menos sensible.</p>
Rango dinámico de detección estrecho	Rango dinámico de detección amplio
durante la fase exponencial	Detección durante la fase exponencial temprana (máxima eficiencia de reacción).
Menor sensibilidad	Mayor sensibilidad
Menor especificidad	Mayor especificidad con el uso de sondas
Requerimiento de equipamiento y reactivos de bajo costo	Requiriendo de equipamiento y reactivos muy costosos
<p>Lectura</p> 	<p>Lectura</p> 

Fuente: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

OTRAS PRUEBAS

Prueba de Papanicolaou

La prueba de Papanicolaou es usada en todo el mundo como método de exploración para la detección del cáncer pre invasivo e invasivo temprano del cuello uterino.

La prueba consiste en tomar una muestra de células epiteliales de la superficie del cuello uterino usando una espátula u otro instrumento para el muestreo.

La Tinción de Papanicolaou es una tinción policrómica con el que se busca obtener contraste entre el núcleo y el citoplasma de las células; consiste en introducir las laminillas, de una manera secuencial y por tiempo predeterminado, en diferentes soluciones que incluyen: agua, alcohol etílico a diferentes concentraciones, colorantes, acetona y xilol con el propósito hidratar las células y prepararlas para la tinción, colorear los componentes celulares y facilitar la observación al microscopio⁽²⁶⁾.

Colposcopia

Es un procedimiento exploratorio instrumentado estereoscópico que realiza el médico específicamente capacitado en colposcopia, en el que se emplea un microscopio modificado con magnificaciones a través del cual se puede observar el tracto reproductor inferior periné y ano, visualizándose las condiciones de su epitelio. El colposcopista establece la sospecha diagnóstica colposcópica, realiza biopsia dirigida y efectúa el tratamiento correspondiente⁽²⁷⁾.

METODOLOGÍA

TIPO DE INVESTIGACIÓN

El enfoque de esta investigación fue de tipo cuali-cuantitativa, cualitativa ya que se extrajo información de fuentes bibliográficas y es cuantitativa porque parte de una realidad que se debe conocer y se trabajó con datos representados en tablas con sus respectivos porcentajes.

El cohorte fue de tipo transversal retrospectivo porque se lo realizó en un periodo de tiempo determinado que fue mayo 2017 – junio 2018, diseñado para medir la presencia de HPV en la población definida.

El nivel fue de tipo descriptivo ya que se trabajó con la realidad de los hechos, sobre datos existentes los cuales permitió una visión más amplia del tema.

El diseño fue no experimental porque se trabajó con las condiciones que presentó la investigación sin manipular variables

DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA.

La población de estudio para este proyecto de investigación estuvo constituida por 53 muestras que fueron realizadas por raspado de cuello uterino en el área de Laboratorio Clínico del Hospital Andino de Riobamba durante el periodo mayo 2017 – junio 2018.

La muestra con la que se trabajó fue el universo de la población, resultados obtenidos de Biología Molecular por el método de PCR en tiempo real.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica realizada fue la observación y el instrumento fue la guía de observación (Anexo 1).

PROCEDIMIENTO

Para la realización del proyecto de investigación en primera instancia se realizó un acercamiento administrativo con las autoridades para obtener una autorización del Tema de Investigación basado en la obtención de resultados de las pruebas realizadas de HPV (Anexo 2). Una vez obtenido la autorización se coordinó con el personal competente para la recolección de los datos estadísticos de las pruebas realizadas de Biología Molecular en el periodo mayo 2017 – junio 2018 por el método de PCR en tiempo Real (Anexo 3).

Los resultados obtenidos fueron de 53 pacientes con diagnóstico presuntivo de ASCUS, los cuales fueron relacionados con los resultados obtenidos por la técnica de PCR en tiempo real.

ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis estadístico de datos se utilizó el paquete de Windows 10, Microsoft Excel, para ingreso de datos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla N°2. Presencia del HPV de alto y bajo riesgo en el Hospital Andino

	Frecuencia	Prevalencia	Porcentaje
HPV alto riesgo	12	0,2264	22,64%
HPV bajo riesgo	41	0,7736	77,36%
Total	53	1	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

$$\textit{Prevalencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de casos con la enfermedad en un momento dado}}{\text{Total de población en ese momento}} \times 100$$

$$\textit{Prevalencia} = \frac{12}{53} = 0,2264 \times 100 = 22,64\%$$

En la tabla N°1 se puede apreciar que, de los 53 resultados obtenidos en el Hospital Andino de Riobamba, el 22,64% fueron HPV de alto riesgo con 12 resultados positivos, mientras que el 77,36% con 41 resultados fueron HPV de bajo riesgo, dándonos a conocer que el HPV con mayor prevalencia fue el HPV de bajo riesgo. En estudios realizados, en el Hospital Carlos Andrade Marín en el año 2013, señala que la prevalencia de HPV de alto riesgo fue del 11,9% y HPV de bajo riesgo 88,1% en lo cual hay una relativa concordancia con los resultados del presente trabajo realizado. VivarDíaz, N⁽²⁸⁾. Así mismo en otro Investigación con embarazadas del Hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora en el año 2014 indica que la prevalencia del virus de alto riesgo es del 51%, virus de bajo riesgo es de 32,7%, el 6% de pacientes presento una infección mixta y el (10,2%) no se logró determinar el genotipo por una carga viral baja. Goyes, M⁽²⁹⁾. Por otro lado, en la ciudad de Cuenca en el año 2013, en estudio con una población de 110 mujeres obtuvo resultados en donde el 72,7% presentaba HPV de alto grado y el 27,3% presento HPV de bajo riesgo. Coronel Daquilema, V⁽³⁰⁾. En ambos casos no existe una relación con el presente trabajo realizado ya que el HPV del alto riesgo tiene una prevalencia mayor en las dos investigaciones, esto puede deberse al tipo de población y área geográfica estudiada.

Tabla N°3. HPV de alto riesgo relacionado con edades

Edad	HPV Alto Riesgo	
	n	%
24 años	2	17%
25 años	1	8%
27 años	1	8%
29 años	1	8%
35 años	2	17%
38 años	1	8%
39 años	1	8%
40 años	1	8%
59 años	1	8%
71 años	1	8%
Total	12	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

En la tabla N°2 se puede observar que, el HPV de alto riesgo se presentó con más frecuencia en mujeres en edades de 24 y 35 años de edad con dos casos respectivamente (17%), por otro lado, en edades como 25, 27, 29, 38, 39, 40, 59 y 71 años de edad se presentó con un caso respectivamente (8%). En estudios realizados en la ciudad de Cuenca en el año 2013, con una población de 110 mujeres indica que la presencia de la infección por HPV de alto riesgo es más común en mujeres de 20 a 29 años, en la cual si existe una relación con la investigación del trabajo realizado ya que parte de la población más afectada es de 24 años. Coronel Daquilema, V⁽³⁰⁾. En otra Investigación con embarazadas del Hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora en el año 2014, indica que la prevalencia del HPV de alto riesgo fue del 53,6% en mujeres de 20 a 26 años de edad y el 46,4% pertenecen al grupo 27 a 35 años de edad. Goyes, M⁽²⁹⁾. Y en el Hospital Carlos Andrade Marín en el año 2013, se detectó al Virus de alto riesgo con el 11,9% en mujeres de 34 a 52 años de edad. Vivar Díaz, N⁽²⁸⁾. En ambos casos también existió una relación con la investigación del trabajo realizado ya que la población más afectada se encuentra entre los 24 y 35 años de edad.

Tabla N°4. HPV de bajo riesgo relacionado con edades

Edad	HPV bajo riesgo	
	n	%
21 años	1	2%
25 años	1	2%
29 años	1	2%
32 años	2	5%
34 años	1	2%
36 años	4	10%
38 años	5	12%
41 años	6	15%
44 años	4	10%
49 años	3	7%
55 años	6	15%
60 años	5	12%
85 años	2	5%
	41	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

Lo que se puede interpretar en la tabla N°3 es que, el HPV de bajo riesgo afecta con más frecuencia a mujeres en edades de 41 y 55 años, con 6 casos respectivamente (15%), seguido por las edades de 38 y 60 años, con 5 casos (12%), por otro lado también se puede observar en las edades de 36 y 44 años, con 4 casos (10%), a continuación en una edad de 49 años con 3 casos (7%), así mismo en las edades de 38 y 85 años con 2 casos (5%), y finalmente mujeres en edades de 21, 25, 29 y 34 años con 1 caso (2%). En estudios realizados en la ciudad de Cuenca en el año 2013, en una población de 110 mujeres indica que la presencia de HPV de bajo riesgo es de un 27.3% con una mayor frecuencia en mujeres entre 31 y 40 años de edad. Coronel Daquilema V⁽³⁰⁾. En lo cual hay una ligera relación con la presente investigación ya que la población más afectada fue de 36 a 60 años de edad.

Tabla N°5. Diagnóstico presuntivo de las pacientes por citología convencional

Diagnóstico presuntivo por citología convencional	n	%
ASCUS	52	98%
LSIL	0	0%
HSIL	1	2%
Total	53	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

Lo que la Tabla N°4 puede indicarnos es que, la mayoría de pacientes que acudieron al área de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba ingreso con un diagnóstico presuntivo de ASCUS, con 52 pacientes (98%) y HSIL 1 paciente (2%). Por otro lado, se puede observar que no existió ninguna paciente con un diagnóstico de LSIL. En una investigación realizada en la ciudad de Cuenca en Solca en el año 2013 se encontró que las lesiones pre malignas o malignas se presentan con mayor frecuencia en ASCUS 53.40%, LIE bajo grado 23.70% AGC 8,68%, LIE de alto grado 6,22%, Carcinoma escamoso 3,52%, ASC-H 1,64%. Castro, P ⁽³¹⁾. En la cual si existe una relativa concordancia ya que la mayoría de pacientes acudieron con un diagnóstico de ASCUS. En otro estudio realizado en Bogotá en el año 2015, el porcentaje de casos positivos según diagnóstico citológico fue: 60,2% en ASCUS, 84,7% en LIEBG y 84,5% en LIEAG. Trujillo, E y Morales, N ⁽³²⁾. En la cual no hay relación con los resultados de la presente investigación ya que la mayoría de pacientes acudieron con un diagnóstico presuntivo de ASCUS y ninguno con LSIL o HSIL, lo que puede deberse al uso de técnicas de laboratorio más específicos.

Tabla N°6. Resultados positivos para LSIL según PCR en Tiempo Real.

Diagnóstico de la citología convencional	Diagnostico por PCR (LSIL)	
	n	%
ASCUS	41	100%
LSIL	0	0%
HSIL	0	0%
Total	41	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

En la Tabla N°5 se puede observar que, luego de la realización de la Prueba para identificación de HPV mediante PCR en tiempo Real, 41 pacientes que acudieron con un presunto diagnóstico de ASCUS, resultaron ser positivo para LSIL (100%). En una investigación realizada en la ciudad de Ambato en el año 2016 se determinó que, de 43 pacientes con un diagnóstico de atipias el 9.30%, presentó genotipos de HPV de bajo riesgo. Ramos, R ⁽³³⁾. En lo cual no hay una relativa relación con la investigación realizada ya que la totalidad de reportes por Atipias fue detectada con un HPV de bajo riesgo, esto puede deberse a que el HPV de alto grado sea más frecuente en dicha Ciudad.

Tabla N^o7. Resultados positivos para HSIL según PCR en Tiempo Real.

Diagnóstico de la citología convencional	Diagnostico por PCR (HSIL)	
	n	%
ASCUS	11	92%
LSIL	0	0%
HSIL	1	8%
Total	12	100%

Fuente: Archivos de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba

En la Tabla N^o6 se puede observar que, luego de la realización de la Prueba para identificación de HPV mediante PCR en tiempo Real, 11 pacientes que acudieron con un presunto diagnóstico de ASCUS, resultaron ser positivo para HSIL (92%). Por otro lado, se puede evidenciar que 1 paciente acudió con un diagnóstico de HSIL y al realizar la prueba de PCR nos confirmó su diagnóstico. En una investigación realizada en la ciudad de Ambato en el año 2016 se determinó que, de 43 pacientes con un diagnóstico de atipias el 90.70%, presentó genotipos de HPV de alto riesgo oncogénico. Ramos, R⁽³³⁾. En lo cual no hay una relativa relación con la investigación realizada ya que la mayoría de reportes por Atipias fue detectada con un HPV de bajo riesgo.

CONCLUSIONES

- Se identificó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real 18 genotipos de HPV de alto riesgo, el dónde el 22,64% de la población pertenece a este grupo, siendo la población más afectada mujeres de edades entre los 24 y 35 años y el 77,36% de la población fue diagnosticada por HPV de bajo riesgo, siendo la población más afectada mujeres entre los 36 y 60 años de edad.
- La prueba de PCR es muy usada al momento del estudio de cepas de HPV, con una especificidad y sensibilidad más alta que otras pruebas como captura híbrida que tiene muchos falsos positivos al tener reacciones cruzadas o Papanicolaou que nos indica solamente la presencia de daño epitelial, lo que le da mayor confianza y credibilidad a la técnica de PCR en tiempo real.
- El diagnóstico presuntivo con el que acuden las pacientes al laboratorio según citología convencional fueron de ASCUS 92% y HSIL 2% y al relacionarla con los resultados arrojados por la prueba realizada de PCR en tiempo real, se concluye que 41 pacientes arrojaron un resultado de LSIL y 12 pacientes arrojaron un resultado de HSIL. Dando a conocer que la terminología de ASCUS no es un diagnóstico definitivo para relacionarla con HPV de alto o bajo riesgo y necesita de una prueba adicional confirmatoria para dar un diagnóstico final a la paciente.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda a la institución a cargo buscar las estrategias correspondientes para la creación de nuevos métodos de PCR en Tiempo Real en el cual se pueda identificar el gen exacto del virus sin perder su sensibilidad y especificidad y así tener mayor confianza al momento de trabajar y dar un resultado.
- Se recomienda usar todos los protocolos de bioseguridad al momento de trabajar con este tipo de muestras ya que al estar trabajando con material genético existe un gran riesgo de contaminación de la muestra al momento de trabajar y producir una posible contaminación cruzada.
- Recomiendo realizar más investigaciones sobre el virus del papiloma humano ya que en la provincia de Chimborazo no se cuenta con cifras estandarizadas sobre la prevalencia genotípica del Virus y factores de riesgo asociados a la región geográfica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.** Venegas Rodríguez, M. (2017). Guía de práctica clínica para la prevención y manejo del cáncer de cuello uterino. 1st ed. [citato el 16 Jun. 2018]. [libro electrónico] Lima: Ministerio de Salud Perú, p.11. Disponible en: http://ftp://ftp2.minsa.gob.pe/descargas/Prevencion_salud/guia_tecnica_cancer_cuello_uterio.pdf
- 2.** Vasquez Bonilla Virus Del Papiloma Humano: Revisión de la Literatura. (2017). 1st ed. [libro electrónico] Tegucigalpa: Tegucigalpa, Honduras, Hospital Escuela universitaria, Clínica Periférica de Emergencia “CLIPER HATO”, pp.73,74. [Citado el 30 Jul. 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/315764392_Virus_del_papiloma_humano_Revision_de_la_literatura
- 3.** Palacios Rodríguez, O. (2018). Dominios culturales de Salud Sexual y Virus del Papiloma Humano en adolescentes mexicanos. 1st ed. [libro electrónico] Guadalajara: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 4 Universidad de Guadalajara México, p.153. [citado el 15 Jun. 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesp/v9n2/2011-3080-cesp-9-02-00152.pdf>
- 4.** American Cancer Society. Que es el Cáncer de Cuello Uterino. [en línea] <https://www.cancer.org>. (2016). [Citado el: 30 Jun. 2018]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- 5.** Organización Mundial de la Salud. (2017). Virus del papiloma humano (VPH). [citato el 15 Jun. 2018]. [en línea] Disponible en: <http://www.who.int/immunization/diseases/hpv/es/>
- 6.** Chavaro, D. (2009). <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091g.pdf>. 1st ed. [libro electrónico] Ciudad de Mexico: ABC American British Cowdray., pp.62,63,68. [citato el 16 Jun. 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091g.pdf>
- 7.** Belalcazar Sánchez, Y De La Cruz Moreira, E. (2014). Barreras Que Enfrentan Las Mujeres De 40 A 65 Años Que Acuden A La Consulta De Ginecología De La Unidad Metropolitana De Salud Sur Para La Realización De La Citología Cervicouterina Y La Comprensión Del Cáncer De Cérvix Comparadas Con Las Mujeres De 21 A 39 Años, En El Período Octubre A Diciembre 2013. Cuarto Nivel. Pontificia Universidad Católica Del Ecuador.
- 8.** Arias Stella, J. (2008). Principios de Procesamiento en Patología Quirúrgica. 1st ed. [Libro electrónico] Bucaramanga - Colombia: Julio Alexander Díaz Pérez, p.295. [Citado el 28 Aug. 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Julio_Diaz-Perez/publication/294194162_Principios_de_Procesamiento_en_Patologia_Quirurgica/links/56bedb2b08aeeba05613156/Principios-de-Procesamiento-en-Patologia-Quirurgica.pdf

- 9.** Cardinal, L. (2009). Anatomía, citología e histología del cuello uterino, la vagina y la vulva normales y patológicos. Ecosistema vaginal. 1st ed. [libro electrónico] España, pp.4,5. [citado el 29 Jul. 2018]. Disponible en: <http://media.axon.es/pdf/65277.pdf>
- 10.** Ramos Campi, Y. (2013). La Citología Cervicouterina. 2nd ed. Riobamba, pp.80,81,82,83,84,85.
- 11.** Carvalho, G. (2010). Citología del tracto genital Femenino Primer paso para detectar el cáncer de cuello uterino. 5th ed. Brazil: Miembro Emérito del Colegio Brasileño de Cirujanos, pp.25,26,27,28.
- 12.** Ortiz Serrano, R. and Uribe Pérez, C. (2004). Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 55, [en línea] (2), pp.148,149,150. [Citado el 15 Jul. 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/255654758_Factores_de_riesgo_para_cancer_de_cuello_uterino
- 13.** Laudi, D. (2014). Guía Programática Abreviada para el tamizaje de CÁNCER CERVICOUTERINO. 1st ed. [Libro digital] Argentina: Dr. Escoto, Luis Roberto OPS/OMS, pp.7,8,9. [Citado el 13 Jul. 2018]. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000433cnt-Guia_Programatica_Abreviada_BAJA.pdf
- 14.** Ministerio de Salud y Protección Social (2012). Lineamientos técnicos y operativos para la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH). Colombia: Instituto Nacional de Salud, pp.8,9,10,11.
- 15.** Clarke Pearson, D. and Soper, J. Manejo del Cáncer Ginecológico Identificación, Diagnóstico y tratamiento. 1st ed. Gabriel Santa Cruz, (2011). pp.40,41,42.
- 16.** Sociedad estadounidense de Oncología Clínica (2017). Cáncer de cuello uterino: Factores de riesgo. Estados Unidos: Junta Editorial de Cancer.Net, pp.1.
- 17.** Organización Mundial de la Salud (2018). Papilomavirus humanos (PVH) y cáncer cervicouterino. Región Americana: OMS, pp.1,2,3.
- 18.** Sanabria Negrín, D. (2009). Virus del Papiloma humano. 1st ed. [libro electrónico] Pinar del Río: Universidad de Ciencias Médicas, pp.4.5.7.11. [citado el 17 Jun. 2018]. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/virusdelpapilomahumanosanabria.pdf>
- 19.** Morse, S., Ballard, R., Holmes, K. and Moreland, A. 4th ed. Estados Unidos: Amolca. Atlas de enfermedades Transmitidas sexualmente y Sida., (2013). pp.186,187,188.
- 20.** Santos López, G. (2018). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. Revista Médica Instituto de México Seguro Social, [en línea] (1), pp.166,167,167. [Citado el 14 Jul. 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152h.pdf>

- 21.** Gisela Mayra, B. and Abisai, M. (2015). Conocimiento y prácticas de prevención sobre el virus del papiloma humano (VPH) en universitarios de la Sierra Sur, Oaxaca. *Scielo*, [en línea] (4), pp.2,3. [Citado el 28 Aug. 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832015000500007
- 22.** Alfaro Castro, A. and Fournier Pérez, M. (2013). Virus del papiloma Humano. *Revista Médica De Costa Rica Y Centroamérica*, [en línea] (1), pp.212,213. [Citado el 3 Jul. 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc132d.pdf>
- 23.** Guiarte Fruns, L. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. 1st ed. [Libro digital] Mexico: Amelia Cornejo Romero, Alejandra Serrato Díaz. Disponible en: <https://docplayer.es/2657627-Herramientas-moleculares-aplicadas-en-ecologia-aspectos-teoricos-y-practicos.html> [Accessed 15 Aug. 2018].
- 24.** Organización Panamericana de la Salud (2016). Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Washington: Organización Panamericana de la Salud, pp.11,12.
- 25.** Loustalot Laclette, M. and Espinosa Romero, R. (2007). Manual de procedimientos para la toma de muestra de citología cervical. 1st ed. [libro] Mexico Distrito Federal: Lic. Emylsen García Morell, pp.10,11,12,13,14,15,16. [Citado el 28 Jul. 2018]. Disponible en: http://cneqsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/CaCu/toma_muestra.pdf
- 26.** Varela Martínez, S. (2006). Citología Cervical. *Revista Medica Honduras*, (1), pp.133,134,135
- 27.** Concha Rogazy, M. (2018). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Revista cielo*, [en línea] (1), pp.2009,2010. [citado el 29 Jul. 2018]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v24n3/art06.pdf>
- 28.** Vivar Diaz, N. (2013). Prevalencia de Infecciones por virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico en mujeres de 30 a 65 años de edad afiliadas al seguro social. *Revista Medica*, [en línea] (1), p.8. Disponible en: https://www.netlab.com.ec/publicaciones/PREVALENCIA_HP.V.pdf [Accessed 15 Jul. 2018]
- 29.** Goyes, M. (2014). Prevalencia de infección por virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) en embarazadas controladas por consulta externa del Hospital Gineco Obstétrico Isidro Ayora, de la ciudad de Quito. *Revista Facultad Ciencias Medicas*, [en línea] (1), pp.51,52. [Citado el 15 Jul. 2018]. Disponible en: [http://file:///C:/Users/TecnoSystem%20J&F/Downloads/321-Texto%20del%20art%20C3%ADculo-794-1-10-20170601%20\(1\).pdf](http://file:///C:/Users/TecnoSystem%20J&F/Downloads/321-Texto%20del%20art%20C3%ADculo-794-1-10-20170601%20(1).pdf)
- 30.** Coronel Daquilema, V. (2014). Prevalencia de infección por virus de papiloma humano de alto riesgo y factores asociados en mujeres que acudieron al centro de atención ambulatoria 302 del iess en el año 2013. CUENCA. 2013.. *Medica*.

Universidad de Cuenca.28. Castro, P. (2013). Frecuencia de lesiones premalignas de cerviz uterino y factores de riesgo en pacientes atendidas durante los años 2011 2012 el instituto de cáncer SOLCA -Cuenca.. Medica. Universidad del Azuay.29. 299.

31. Castro, P. (2013). Frecuencia de lesiones premalignas de cerviz uterino y factores de riesgo en pacientes atendidas durante los años 2011 2012 el instituto de cáncer SOLCA -Cuenca.. Medica. Universidad del Azuay.

32. Trujillo, E. and Morales, N. (2015). Distribución de los genotipos del virus del papiloma humano en mujeres de Bogotá con anomalías en la citología cervicouterina. Revista Colombiana de Cancerologia, (1), pp.5,6,7,8.

33.Ramos, R. (2017). Genotipificación del virus del papiloma humano en lesiones displasicas en centros de salud de la ciudad de Ambato 2015-2016”. MAGÍSTER Biotecnología Molecular. Universidad de Guayaquil.

ANEXOS

Anexo 1.

Guía de Observación

12-12-2012

35 [faded text] (-) ✓

36 [faded text] (-) ✓

21-12-2012

37 [faded text] / No detect

38 [faded text] / No detect

07-02-2013

39 [faded text]

06-03-2013

40 [faded text] No detect ✓

41 [faded text] Detectado

42 [faded text] Detectado ✓

43 [faded text] Detectado

10-05-1988

44 [faded text] No detectado

- 11 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ Positivo
- 12 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ (-)
- 13 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ (-) 06003310194
- 14 CR (-)

09-08-2016

- 15 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ 1 Data
- 16 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ No del
- 17 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ No del ✓

31-08-2017

- 18 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ M ✓
- 19 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ M ✓
- 20 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ M ✓
- 21 ~~Plan~~ ~~Guaya~~ ~~Manor~~ M ✓

Anexo 2.

Carta de autorización por parte del Hospital Andino de Riobamba para la realización del proyecto de investigación.

Riobamba, 06 de julio del 2018
OF.No.296-DDI-HACH.2018

Mgs. Ximena Robalino
DIRECTOR DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO DE UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
Presente.-

De mi consideración:

Por medio de la presente y en respuesta al oficio N° 295-CLCH-FCS-2018, de fecha 14 de junio de 2018, AUTORIZO, a la Srta. Tania Brigitte Cabezas Chávez, estudiante de la Universidad Nacional de Chimborazo – Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico, a acudir al Área de Laboratorio Clínico de esta casa de salud, para la realización del Proyecto de **“Virus del Papiloma Humano identificados por Biología Molecular. Hospital General Andino de Chimborazo. Mayo 2017- Junio 2018”**, debiendo cumplir 200 horas, bajo la tutoría de la Dra. Mónica Moreno Jefe del Área de Laboratorio de la Institución.

Recalcando que durante su asistencia, el estudiante no tendrá ninguna relación de tipo laboral con esta casa de salud.

Por la atención prestada mi agradecimiento.

Atentamente,



Urbano Solís Cartas
Especialista en REUMATISMO

Dr. Urbano Solís
ENCARGADO DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL ANDINO DE CHIMBORAZO

Anexo 3.

Certificado de haber cumplido con la obtención
de resultados del Área de Laboratorio Clínico
del Hospital Andino de Riobamba.

Riobamba, 7 de Julio del 2018

A petición verbal de la parte interesada Sta. **Cabezas Chávez Tania Brigitte**, portadora de la cedula de ciudadanía N° **060449735-4**.

CERTIFICO:

Que la señorita estudiante de la Unidad de Titulación de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico accedió al Archivo de datos del área de Laboratorio del Hospital Andino de Riobamba para la recopilación de resultados de exámenes que serán utilizados en el desarrollo del proyecto de investigación con el tema: **“VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO IDENTIFICADO POR BIOLOGIA MOLECULAR. HOSPITAL ANDINO. RIOBAMBA. MAYO 2017- JUNIO 2018”**. Tiempo en el cual demostró responsabilidad, empeño y honradez en las tareas a ella encomendadas.

Es todo cuanto puedo manifestar en honor a la verdad dando autorización a la interesada hacer uso del presente certificado como convenga sus intereses.

Atentamente


Dra. Mónica Moreno

C.I.0602597452

JEFE LABORATORIO CLÍNICO

HOSPITAL GENERAL ANDINO DE CHIMBORAZO

Fundación Social Alemana Ecuatoriana



Dr. Susana Moreno Aviles
FARMACIA Y FARMACIA
L. 51.215 N. 656
S.A.E. I.H.A.A.CH.

Anexo 4.

Guía de Observación: Modelo de pedidos con el
que ingresan las pacientes al área del
Laboratorio con diagnósticos presuntivos
diferentes



UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO

Esmeraldas y Duchicela * Telf.: 2616253 - 2616336 - 2616428

Riobamba, a 11.4.2018

Nombre del Paciente:

Edad: 59

Nº. HC: 20777

IDG: ASUS -

Rp.

- FAVOR RESERVAR P.C. PARA CEDA
UNDA H.P.U.

UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO
Dr. Carlos Cerda Romero
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA
TRABAJO SOCIAL

FIRMA DEL PRESCRIPTOR



UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO

Esmeraldas y Duchicela * Telf.: 2616253 - 2616336 - 2616428

INDICACIONES

65800

Hospital Andino
UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO
Dr. Carlos Cerda Romero
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA
TRABAJO SOCIAL

FIRMA DEL PRESCRIPTOR



TRABAJO SOCIAL
UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO

Esmeraldas y Duchicela - Telf.: 2616-253 / 2616-336 / 2616-428

Riobamba, a 28.6.2017

Nombre del Paciente:

Edad: 74

Nº. HC: S/R

IDG: PIC III + HPU

Rp.

- FAVOR RESERVAR P.C. PARA
CEDA UNDA H.P.U.

UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA CHIMBORAZO
Dr. Carlos Cerda Romero
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA
TRABAJO SOCIAL

FIRMA DEL PRESCRIPTOR

COD:



UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO

Esmeraldas y Duchicela - Telf.: 2616-253 / 2616-336 / 2616-428

INDICACIONES

56735

Hospital Andino

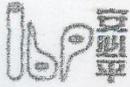
UNIDAD ONCOLÓGICA SOLCA
CHIMBORAZO
Dr. Carlos Cerda Romero
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA
TRABAJO SOCIAL

FIRMA DEL PRESCRIPTOR

COD:

Anexo 5.

Técnica de PCR Fluorescente para la
determinación del Virus del Papiloma Humano
de alto riesgo



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

48 determinaciones por kit

Vida útil: 9 meses.

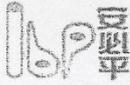
Almacenamiento y Transporte: Almacenar los reactivos de extracción de ácidos nucleicos a temperatura ambiente. Los reactivos de PCR y los controles de calidad son estables de 2 – 8°C durante el transporte; sin embargo, una vez recibidos deben ser almacenados a $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

TABLA DE CONTENIDOS

USO PREVISTO	Página 1
PRINCIPIO	Página 2
MATERIALES PROVISTOS EN EL KIT	Página 2
MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS	Página 3
ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	Página 4
MUESTRAS	Página 4
PROCEDIMIENTO	Página 5
A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	Página 5
B. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	Página 5
C. EXTRACCIÓN DE ADN	Página 6
D. PREPARACIÓN DE LA PCR	Página 7
E. AJUSTE DEL TERMOCICLADOR DE PCR EN TIEMPO REAL	Página 7
F. ANÁLISIS DE RESULTADOS	Página 8
G. DETERMINACIÓN DE RESULTADOS	Página 8
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	Página 10
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO	Página 10
FABRICANTE	Página 11

USO PREVISTO

Este kit es apropiado para la detección de ADN del Virus de Papiloma Humano (18 genotipos: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) en muestras de células desprendidas del cuello uterino o secreciones del tracto genitourinario. Este kit es adecuado para la detección cualitativa de HPV de alto riesgo más no para la tipificación genética. El resultado es



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

sólo para propósitos de información, y no debería ser la base para el diagnóstico final o para descartar casos.

PRINCIPIO

Este kit toma la región variable L1 del genoma de HPV como región diana. Se han diseñado 18 tipos de cebadores y sondas fluorescentes (FAM) específicos, cebadores y sondas fluorescentes marcadas con HEX como control interno, una Hot-Start Taq DNA polimerasa, y otros reactivos para la amplificación de ADN.

Se debe utilizar los reactivos de extracción de ácidos nucleicos provistos en el kit para la preparación de muestras clínicas y la extracción de ADN. Preparar los reactivos de PCR provistos en el kit en tubos de reacción de PCR. Añadir el ADN viral extraído a los tubos de reacción de PCR, utilizar el termociclador de PCR en tiempo real para la amplificación y detección de las señales de fluorescencia. El software del equipo dibujará automáticamente la curva de amplificación en tiempo real, y la detección de las muestras desconocidas podrá ser realizada.

MATERIALES PROVISTOS EN EL KIT

	Nombre	Contenido
Reactivos para la Extracción de Ácidos Nucleicos	Columna de centrifugación	48 unidades
	Tubo de colección	2 x 96 unidades
	Solución de lisis del virus	1 x 11 ml
	Buffer de remoción del inhibidor (concentrada)	1 x 16.5 ml
	Solución de desalinización (concentrada)	1 x 11 ml
	Buffer de elución	1 x 6 ml
	Proteinasa K (polvo seco)	2
	RNA carrier (polvo seco)	2



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

Reactivos de PCR	Buffer A HPV	2 x 360 µl
	Buffer B HPV	2 x 75 µl
	Agua Purificada Estéril	2 x 2 ml
Controles de Calidad	Control Negativo	2 x 50 µl
	Control Positivo HPV	2 x 50 µl

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Sistema óptico de detección fluorescente programable (Termociclador PCR Tiempo Real)
- Cabina de flujo laminar
- Tubos para centrifuga de 1.5 ml
- Tubos para reacción de PCR
- Guantes desechables de látex libres de talco o material similar
- Microcentrifuga de mesa (3,000 - 12,000 RPM)
- Bloque de calentamiento (72°C)
- Vortex
- Micropipetas y puntas estériles con filtro o desplazamiento positivo (0.5-10µl, 2-20µl, 5-50µl, 50-200µl)
- Solución Salina

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este kit está diseñado exclusivamente para uso *in vitro*.

1. Por favor lea cuidadosamente las instrucciones de uso antes de utilizar.
2. Manipular y descartar todas las muestras biológicas como si fuesen capaces de transmitir agentes infecciosos. Evite el contacto directo con las muestras biológicas. Evite derrames o aerosoles.
3. Manipular y descartar todos los reactivos y materiales utilizados para llevar a cabo el ensayo como si fuesen capaces de transmitir agentes infecciosos. Evite el contacto directo con los



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

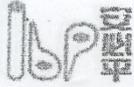
CP. 008. 019

- reactivos. Evite la producción de derrames y aerosoles. Los desechos deben ser manipulados y descartados de acuerdo a medidas adecuadas de seguridad.
4. Los procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción reversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados erróneos, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.
 5. Es necesario disponer de zonas separadas para la extracción/preparación de reacciones de amplificación y para la amplificación/detección de productos amplificados. Nunca introduzca un producto de amplificación en el área diseñada para la extracción/preparación de reacciones de amplificación.
 6. Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados bajo una cabina de flujo laminar. Las pipetas deben ser de dispensación positiva o utilizar puntas con filtro. Las puntas empleadas deben ser estériles, libres de ADNasas y ARNasas, libres de ADN y ARN.
 7. Descongelar completamente todos los reactivos antes de usar, centrifugar a 8,000 rpm por 10 segundos. Evitar la congelación-descongelación repetida de los reactivos.
 8. Almacenar todas las muestras de extracción de ácidos nucleicos a -20°C si no van a ser utilizadas inmediatamente.
 9. No utilizar el kit después de la fecha de expiración provista.

MUESTRAS

Este kit debe ser utilizado con las siguientes muestras biológicas: células desprendidas del cuello uterino o secreciones del tracto genitourinario.

Las muestras pueden ser utilizadas inmediatamente o almacenadas de $4 - 8^{\circ}\text{C}$ por dos semanas. Las muestras pueden ser almacenadas a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ en una solución de preservación de 6 a 12 meses luego de eluir las células, se debe centrifugar la muestra para remover la solución de preservación antes de su uso. Para distancias largas, las muestras deben transportarse en un bloque de hielo a 0°C .



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

PROCEDIMIENTO

A. Preparación de Muestras:

1. Marcar las muestras y preparar tubos para centrifuga de 2 ml, respectivamente.
2. Añadir 1 – 2 ml de solución salina al tubo que contiene el cepillo y empapar completamente el hisopo en el líquido, agitar durante 30 – 60 segundos para lavar las células en el líquido y luego transferir la mezcla obtenida del lavado a los tubos de 2 ml apropiados.
3. Centrifugar la mezcla a 10,000 rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante.
4. Añadir 1 ml de solución salina al sedimento, lavar y precipitar por completo, luego centrifugar la mezcla 10,000 rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante.
5. Colocar 200 µl de solución salina al sedimento, agitar durante 30 – 60 segundos para re-suspender el sedimento. O tomar la cantidad de muestra de acuerdo al protocolo de extracción de ADN.
6. Proceder a la Sección C. Extracción de ADN.

B. Preparación de Reactivos

1. Añadir 1375 µl de Buffer de Elución (provisto en el kit) a la Proteinasa K (polvo seco, provisto en el kit), mezclar bien, y almacenar a -20°C después de su completa disolución.
2. Añadir 110 µl de Buffer de Elución (provisto en el kit) al RNA Carrier (polvo seco, provisto en el kit), mezclar bien, y almacenar a -20°C después de su completa disolución (El RNA Carrier es blanco o semi-transparente. Por favor, asegurarse de que éste se ha disuelto por completo).
3. Añadir 10 ml de etanol absoluto al Buffer de Remoción del inhibidor (concentrado, provisto en el kit) y preservar a temperatura ambiente.
4. Añadir 44 ml de etanol absoluto a la Solución de Desalinización (concentrada, provista en el kit) y preservar a temperatura ambiente.
5. Antes del experimento, la Solución de Lisis del Virus (provista en el kit) debe ser mezclada con la Solución de RNA Carrier (recién preparada). Las proporciones de preparación de la mezcla se muestran a continuación:



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

	1 determinación	24 determinaciones	48 determinaciones
Solución de Lisis del Virus	200 μ l	4.8 ml	9.6 ml
RNA Carrier	4 μ l	96 μ l	192 μ l

Nota: Si la Solución de Lisis del Virus y el Buffer de Remoción del Inhibidor son inapropiadamente colocados a bajas temperaturas, puede ocurrir cristalización y precipitación. Incubar las soluciones a 37°C hasta que los cristales y precipitados desaparezcan. No olvidar de cerrar la tapa después del uso.

6. Proceder a la Sección C. Extracción de ADN.

C. Extracción de ADN

1. Añadir 50 μ l de Proteinasa K a las muestras de células preparadas en la Sección A. Preparación de Muestras.
2. Colocar 200 μ l de la Solución de Lisis del Virus (que contiene el RNA Carrier).
3. Cerrar la tapa y mezclar bien por vórtex durante 15 segundos.
4. Centrifugar a máxima velocidad por 10 segundos para prevenir la generación de burbujas durante la incubación.
5. Calentar la mezcla a 72°C por 10 minutos.
6. Pre-calentar el Buffer de Elución a 72°C.
7. Añadir 250 μ l de etanol absoluto y mezclar por vórtex durante 15 segundos.
8. Pipetear toda la mezcla a una columna de centrifugación, centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, y colocar la columna en un tubo de colección limpio.
9. Adicionar 500 μ l de Buffer de Remoción del Inhibidor a la columna de centrifugación, centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, y colocar la columna en un tubo de colección limpio.
10. Adicionar 500 μ l de la Solución de Desalinización a la columna de centrifugación, centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, y colocar la columna en un tubo de colección limpio.
11. Adicionar nuevamente 500 μ l de la Solución de Desalinización a la columna de centrifugación, centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, y colocar la columna en un tubo de colección limpio.



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

12. A temperatura ambiente, centrifugar la columna de centrifugación – tubo de colección a 12,000 rpm por 2 minutos para remover el etanol residual.
13. Colocar la columna de centrifugación en un tubo limpio de 1.5 ml, abrir la tapa de la columna y calentar a 72°C por 2 minutos (usar el bloque de calentamiento, el baño maría no puede ser utilizado).
14. Añadir 60 µl del Buffer de Elución pre-calentado justo sobre la membrana de la columna de centrifugación.
15. Cerrar la tapa de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
16. Centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos. La sustancia en el tubo de centrifugación es la solución de ácido nucleico viral. Se recomienda usar la solución inmediatamente o almacenarla a -20°C para su uso posterior.
17. Proceder a la Sección D. Preparación de la PCR.

D. Preparación de la PCR

1. Tomar varios tubos para reacción de PCR. Añadir 15 µl de Buffer A HPV (provista en el kit), 3 µl de Buffer B HPV (provista en el kit) y 12 µl de Agua Purificada Estéril (provista en el kit) a cada tubo.
2. Añadir 20 µl de las muestras preparadas en la sección C. Extracción de ADN, 20 µl de control negativo y 20 µl de control positivo de HPV a los tubos de PCR preparados en el paso 1.
3. Centrifugar a 3,000 rpm durante 30 segundos.
4. Cargar los tubos en el termociclador de PCR en Tiempo Real y proceder con la sección E. Ajustes del Termociclador de PCR en Tiempo Real.

E. Ajustes del Termociclador de PCR en Tiempo Real

Por favor tener en cuenta que el procedimiento es para el ABI 7500. Para todos los demás Termocicladores PCR Tiempo Real, favor consultar el manual de operación del fabricante.

1. Abrir el programa ABI 7500.
2. Ajustar el "reporter dye 1" como FAM
3. Ajustar el "quencher dye 1" como NONE
4. Ajustar el "reporter dye 2" como VIC
5. Ajustar el "quencher dye 2" como NONE
6. Ajustar el "passive reference" como NONE



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

- Ajustar el tipo de reacción como control negativo (NTC), muestra (UNKNOWN), control positivo (STANDARD) de acuerdo a la posición del tubo en los pozos del instrumento.
- Introduzca las concentraciones de los controles de referencia cuantitativos.
- Ajustar las condiciones de ciclado:

Programa	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
1	95°C	15:00	1
2	94°C	0:15	40
	55°C	0:45	

- Ajustar "Data Collection" a "etapa 2, paso 2 (55@0:45)"
- Guardar y hacer click en Correr.

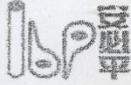
F. Análisis de Resultados

- Hacer click en "Results" y seleccionar "Amplification Plot".
- Hacer click en "Graph Settings" y seleccionar "Linear".
- Ajustar el umbral, de acuerdo a la curva de amplificación.
- Ajustar la línea base de acuerdo a la curva de amplificación o al valor inicial (entre 8 y 10) y valor final (entre 15 y 20).
- Hacer click en "Analyze".

G. Determinación de Resultados

- Control de Calidad

Control de Calidad	Canal de Detección	Curva de Amplificación
Control Negativo	FAM	No incrementa en la fase logarítmica
	VIC	No incrementa en la fase logarítmica
Control Positivo	FAM	Incremento obvio en la fase logarítmica y Ct < 35
	VIC	Incremento obvio en la fase logarítmica y Ct < 37



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

Tener en cuenta que si los requisitos de control de calidad antes mencionados no se cumplen, el ensayo es considerado no válido y debe repetirse.

2. Muestra

Canal de Detección	Curva de Amplificación	Resultado
FAM	No incrementa en la fase logarítmica	Negativo
VIC	Incremento obvio en la fase logarítmica	
FAM	Ct > 37 e incremento obvio en la fase logarítmica	
VIC	Ct > 37 e incremento obvio en la fase logarítmica	
FAM	Ct ≤ 37 e incremento obvio en la fase logarítmica	Positivo
VIC	Ct ≤ 37 e incremento obvio en la fase logarítmica	
FAM	Ct ≤ 33 e incremento obvio en la fase logarítmica	
VIC	No incrementa en la fase logarítmica	

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este kit es usado para detección cualitativa. Sólo puede identificar el virus si la muestra está infectada con alguno de los 18 tipos de HPV en el rango de detección de este kit. No se puede diferenciar una infección simple de una infección mixta. Además, no es posible detectar si la muestra está infectada con un virus de HPV de bajo riesgo ni se puede identificar el tipo de HPV.

La contaminación cruzada que puede ocurrir durante la recolección, procesamiento, transporte y conservación de la muestra, producirá falsos resultados.



Instrucciones de Uso
Kit de PCR Fluorescente para la Determinación del
Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo

CP. 008. 019

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Límite de Detección Bajo: 1.0×10^4 copias.
Rango de Detección: 1.0×10^4 a 1.0×10^7 copias.

Este kit no tiene reacción cruzada con los tipos comunes de HPV (como 6/11/40/42/43/44/54/61/70/72/81/83/cp8304) en el rango de detección de otros kits, ni con las patologías generadas por especies similares o síntomas similares (como *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, Virus de Herpes Simple tipo 2, y Citomegalovirus).

FABRICANTE

Guangzhou LBP Medicine Science and Technology Co., Ltd.

Dirección del Fabricante: No. 19 Xiangshan Road, Luo Gang District, Guangzhou, Guangdong, P. R. China

Código Postal: 510665

Tel: +86-20-32299997, Fax: +86-20-32068126

Página web: <http://www.gzlbp.com>

Anexo 6.

Recolección de datos del área de laboratorio
clínico del Hospital Andino de Riobamba.



Anexo 7.

Certificado del cumplimiento de las 400 horas
de Titulación.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

FORMATO DE CUMPLIMIENTO DE LAS 400 HORAS PREVIO A LA DEFENSA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

DATOS INFORMATIVOS COORDINADOR DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN

Apellidos: Cordovéz Martínez
Nombres: María del Carmen
Cédula de I.: 1757161482
Tutor/Miembro: MgS. Yisela Carolina Ramos Campi

DATOS INFORMATIVOS ESTUDIANTE

Apellidos: Cabezas Chávez
Nombres: Tania Brigitte
Cédula de I.: 060449735-4
Estudiante de la carrera de: Laboratorio Clínico e Histopatológico
Título del Proyecto de Investigación: VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO IDENTIFICADOS POR BIOLOGÍA MOLECULAR. HOSPITAL ANDINO. RIOBAMBA. MAYO 2017 – JUNIO 2018

Certifico que el estudiante ha culminado con las 400 horas de los componentes de organización del aprendizaje en la Unidad de Titulación Especial, requisito previo a la defensa del proyecto de investigación.

Nombre Coordinador de la Unidad Especial:
Firma y Número de C.I.: 1757161482
Lugar y Fecha: Riobamba 17 de agosto del 2018

Campus Norte "Edison Riera R."
Avda. Antonio José de Sucre, Km. 1.5 Vía a Guano
Teléfonos: (593) 31 31 30 880-ext. 3000

Campus "La Dolorosa"
Avda. Eloy Alfaro y 10 de Agosto
Teléfonos: (593) 31 31 30 910-ext. 3001

Campus Centro
Duchicela 17.75 y Princesa Taca
Teléfonos: (593) 31 31 30 880-ext. 3500

Campus Guano
Parroquia La Matriz, Barrio San Roque
vía a Asaco