



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA**

UNAN–Managua

Instituto Politécnico de la Salud

Luis Felipe Moncada

Licenciatura en Microbiología



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN
PACIENTES ATENDIDAS EN CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL BERTHA
CALDERÓN ROQUE, NOVIEMBRE 2015-FEBRERO 2016.**

Autores:

Br. Cristiana Paola Cabezas Robelo

Br. Kenia Lizeth García Rosales

Tutora: Msc. Martha Xiomara Guerrero D.

Msc. Ciencias farmacéuticas, Lic. Bioanálisis clínico.

Asesor: Msc. Oscar Arbizú Medina

Msc. Microbiología, Lic. Bioanálisis clínico.

Mayo 2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA**

UNAN–Managua

Instituto Politécnico de la Salud

Luis Felipe Moncada

Licenciatura en Microbiología



TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN
PACIENTES ATENDIDAS EN CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL BERTHA
CALDERÓN ROQUE, ENERO 2015-FEBRERO 2016.**

Autores:

Br. Cristiana Paola Cabezas Robelo

Br. Kenia Lizeth García Rosales

Tutora: Msc. Martha Xiomara Guerrero D.

Msc. Ciencias farmacéuticas, Lic. Bioanálisis clínico.

Asesor: Msc. Oscar Arbizú Medina

Msc. Microbiología, Lic. Bioanálisis clínico.

Mayo 2016

DEDICATORIA

A Dios padre, al brindarnos sabiduría y fortaleza en toda la realización del trabajo. A nuestra Madre, La Virgen María, por ser la intercesora ante el Señor para hacer nuestras carreras de éxito y servicio a la humanidad.

A nuestras familias, por motivarnos y apoyarnos en todo momento de la realización de la investigación.

A nuestras amigas, Justa y Silvia Marcela, por haber sido parte fundamental de nuestro equipo de trabajo en la primera etapa de la investigación.

A Nuestro grupo de Microbiología, Primera Generación, que a pesar de los retos enfrentados logramos concluir nuestros estudios con éxito.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

A nuestro Señor Jesucristo, por darnos cada día el don de la vida, salud, bienestar físico y espiritual para poder continuar con nuestra labor como estudiantes.

A nuestros padres, familiares y amigos, por todo su esfuerzo, amor y apoyo incondicional durante nuestra formación tanto personal como profesional.

A las áreas de Docencia, Patología y Clínica trece del Hospital Bertha Calderón Roque, especialmente a Dra. Sonia Cabezas por su apoyo e interés mostrado en la investigación. A Dr. Camilo Pravia, por compartir sus conocimientos y apoyarnos con las pacientes en estudio.

Nuestros agradecimientos a nuestra tutora, Msc. Martha Xiomara Guerrero, por apoyarnos y brindarnos sus conocimientos durante la realización de esta investigación. A nuestro asesor, Msc. Oscar Arbizú, por su interés y constancia en la contribución de la realización de la técnica.

Al Instituto Politécnico de la Salud, Departamento de Bioanálisis Clínico, al permitir la realización del estudio en laboratorios de Biología Molecular.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASC	Células escamosas atípicas
ASCUS	Células escamosas atípicas de origen incierto o indeterminado
ASCH	Células escamosas atípicas de alto grado no excluidas
CACU	Cáncer cervicouterino
CC	Carcinoma infiltrante del cuello uterino
CE	Células endocervicales
CM	Células metaplásicas
HBCR	Hospital Bertha Calderón Roque
HC2	Captura híbrida de segunda generación
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
ITS	Infecciones de transmisión sexual
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
IVAA	Inspección visual con ácido acético
LA	Linear Array
LEEP	Loop Electro Excision Procedure
LEIBG	Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado
LEIAG	Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical

OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAP	Prueba de Papanicolaou
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Phosphate buffered saline
Pka	Constante de disociación ácida
p53, pRb	Proteína 53, proteína retinoblastoma
RCL	Región larga de control no codificadora
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SB	Sistema Bethesda
SIL	Lesiones Intraepiteliales escamosas
START	Screening Technologies to Advance Rapid Testing for Cervical Cancer
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TM	Temperatura de Mealing
UEC	Unión escamoso-cilíndrica
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del papiloma humano
VPH- BR	Virus del papiloma humano - bajo riesgo
VPH- AR	Virus del papiloma humano - alto riesgo
ZT	Zona de transformación

RESUMEN

Las displasias del cérvix conocidas desde hace años como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y el carcinoma infiltrante del cuello uterino (CC), están relacionadas con el Virus del Papiloma Humano. En Nicaragua el diagnóstico está basado principalmente en la citología, al ser un país subdesarrollado presenta déficit en el diagnóstico molecular debido a los altos costos y a la falta de profesionales capacitados en la técnica de PCR para la detección del genoma viral. El estudio tuvo como objetivo estandarizar la técnica de PCR punto final para la genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015 – Febrero 2016.

Se realizó un estudio cuasi-experimental prospectivo de corte transversal con características operativas, cuya muestra fue de 62 pacientes; 27 pacientes con diagnóstico histopatológico de Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), 23 pacientes con Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG) y 12 muestras utilizadas como control negativo interno. Dos muestras fueron excluidas por no cumplir con nuestros criterios de inclusión. Se realizaron cepillados cervicales, para la extracción del ADN se utilizó la técnica QIAGEN-QIAamp DNA para su posterior genotipificación a través de PCR punto final para subtipos de alto riesgo, VPH 16, VPH 18 y VPH 33.

Los resultados más relevantes fueron: el 66% de las muestras resultaron positivas, el genotipo más frecuente fue el 16 con un 25.8%, el 19.4% de las pacientes presentaron infecciones mixtas con los genotipos 16/18. Las pacientes más afectadas oscilan entre las edades de 26 a 36 años. El 29% de LEIAG están relacionadas al genotipo 16 y un 20% a la infección mixta por los genotipos 16/18. En las LEIBG los genotipos 16 e infección mixta 16/18 fueron los más frecuentes con un 10% para cada caso.

La cuantificación y pureza de las extracciones realizadas se evaluaron mediante Nanodrop resultando óptimas con una DS de 0.25. La técnica PCR punto final estandarizada, obtuvo un límite de detección de 13.2 ng/μl obtuvo un límite de detección de 13.2ng/μl con una sensibilidad y especificidad de 100%, reproducibilidad y repetibilidad de 100% y una eficacia diagnóstica del 100%.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio se recomienda, promover la incorporación y uso de pruebas de detección de ADN viral dirigida a la investigación del Virus del Papiloma Humano y continuar con estudios de los diferentes genotipos de bajo y alto riesgo en esta línea científica.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES	3
II. JUSTIFICACIÓN.....	6
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
IV. PREGUNTAS DIRECTRICES.....	8
V. OBJETIVOS.....	9
5.1 Objetivo general.....	9
5.2 Objetivos específicos.....	9
VI. MARCO TEÓRICO	10
7.1 GENERALIDADES.....	10
7.2 GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO	13
7.3 EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL	15
7.3.1 Cuantificación de ADN.....	18
7.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	19
7.4.1 Templado.....	22
7.4.2 Sistemas de oligonucleótidos	22
7.4.3 Enzima.....	23
7.4.4 Concentración de Magnesio	24
7.4.5 Otros componentes de la reacción.....	24
7.4.6 Etapas	26
7.4.7 Termocicladores	28
7.4.8 Electroforesis.....	29
7.5 ESTANDARIZACIÓN	32
7.6 Parámetros estadísticos de desempeño.....	33
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	41

VIII. PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA LA GENOTIPIFICACION DEL VPH.....	44
IX. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	50
X. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
XI. CONCLUSIONES	73
XII. RECOMENDACIONES	74
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
Anexos.....	81

I. INTRODUCCIÓN

La infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) es considerada actualmente como una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuente en el mundo. La gran mayoría de estas infecciones son asintomáticas o subclínicas, pasan desapercibidas a no ser que se empleen métodos moleculares para detectar fragmentos del genoma en las células infectadas. Casi todas las infecciones son transitorias, pues son controladas por la respuesta inmune, sólo entre el 10% y 20% de las mismas se vuelven crónicas o persistentes, siendo éstas las que tienen mayor potencial oncogénico (UNAM-INcan, 2006).

El Cáncer de Cuello Uterino es el tumor maligno más frecuente en las mujeres provenientes de los países en desarrollo y ocupa el tercer lugar en mortalidad relacionada con las neoplasias malignas en la población en general. En nuestro país dos terceras partes de los tumores malignos se presentan después de los cincuenta años de edad; estos casos representan el 9.0% de las causas de muerte en las mujeres, correspondiéndole al cáncer cervical el 20%.

Cuzick J; Sasieni P; Davies P; et al. describen que muchos países poseen un programa de cribado para el VPH, que implica el protocolo tradicional basado en el frotis de Papanicolaou introducido en 1943, que utiliza una técnica de tinción histológica. Sin embargo, existe un alto número de falsos negativos y falsos positivos de los cuales se debe considerar en el diagnóstico. Por ello, los exámenes de citología tienen limitaciones con respecto a la especificidad y bajo valor predictivo para la patología de alto riesgo causadas por el virus.

La mayoría de los casos aparecen entre las edades de 30 y 50 años, donde su prevalencia varía entre países y estilo de vida de los infectados. El virus del papiloma humano (VPH) juega un papel central en el cáncer de cuello uterino con el 99,7% del ADN del VPH identificado en carcinomas cervicales invasivos. El VPH es una infección de transmisión

sexual común entre los hombres y las mujeres con una incidencia del 70% mayor en las mujeres sexualmente activas (Muñoz. N. & Castellsagué. X., 2006).

Entre los métodos de diagnóstico del cáncer de cérvix más utilizados a nivel nacional son la citología cervical o examen del Papanicolaou, el cual es el método de elección y la forma de prevención oportuna de este. En Nicaragua existe un "Protocolo de Prevención del Cáncer Cervicouterino, a través del Tamizaje con inspección Visual con Ácido Acético (IVAA) y Tratamiento con Crioterapia" que fue publicado en el año 2006 y actualizado en 2010, este tiene como objetivo detectar lesiones precancerosas lo que ayuda a determinar el tratamiento para tomar las medidas de prevención ante este tipo de cáncer.

En la actualidad no existe un ensayo serológico confiable que permita diagnosticar la infección por VPH y el desarrollo de este ensayo tiene que enfrentar obstáculos, como el poco conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de respuesta inmune del huésped a la infección y la evasión de esta respuesta por parte del virus; el hecho de no poder disponer de una proteína viral suficientemente antigénica en cantidades abundantes para desarrollar el ensayo; y por último 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.

El diagnóstico molecular de la infección por VPH, está basado principalmente en métodos como captura híbrida y PCR, ambas técnicas poseen un variabilidad en términos de parámetros de desempeño, siendo la PCR capaz de detectar pequeños fragmentos del ADN con mayor sensibilidad y especificidad, no obstante no ha sido implementada en los protocolos de diagnóstico del Ministerio de Salud debido a su alto costo.

I. ANTECEDENTES

Diversos estudios de la historia natural del cáncer cérvico uterino pretenden definir los factores de riesgo y marcadores moleculares que predigan el comportamiento de una lesión premaligna asociada con la infección de VPH. La mayoría de los VPH infectan el área genital, tanto de hombres como mujeres. El análisis de los genotipos de VPH resulta importante por distintas razones, dentro de estas se encuentra que los VPH afectan tejidos específicos y en general producen diferentes tipos de lesiones.

Fonseca, V; en el estudio sobre diagnóstico y tratamiento ambulatorio sobre las lesiones pre neoplásicas del cérvix en el Hospital Bertha Calderón Roque de Mayo 2006 a Mayo 2007 reportó que las lesiones de bajo grado fueron más frecuentes en la población de 20 a 29 años con el 3.3% de igual manera se observó mayor frecuencia de dichas lesiones en el grupo con dos a tres parejas sexuales.

La detección de signos morfológicos por infección de VPH, es sencilla mediante el examen citológico (PAP) o histopatológico. Sin embargo, el PAP presenta un significativo porcentaje de falsos negativos que alcanza, dependiendo del laboratorio, hasta 20-30% de los frotis examinados (Callaghan. J., Karim. S., Mortlock. S. & Wintert M, 2001).

Además, debe considerarse que la detección indirecta de VPH mediante los exámenes citológicos e histopatológicos, no permite la tipificación viral, importante información en el momento de categorizar subgrupos de pacientes desde una perspectiva clínica práctica (Burd, E., 2003).

“De todos los tipos de tumores registrados por el Ministerio de la Salud de Nicaragua (MINSa), el cáncer cervical uterino es el que más golpea a las mujeres de entre 25 y 64 años, constituyendo la causa principal de deceso. La tasa de mortalidad femenina en Nicaragua registrada 26 por 100 mil habitantes- es la más alta de toda la región centroamericana y se ubica entre las siete más elevadas de América Latina” (UICC, 2009).

La Norma Técnica de Prevención y Detección del Cáncer Cérvico-uterino de la República de Nicaragua publicada en el 2006, indica que la citología cervical brinda un diagnóstico presuntivo de lesiones preinvasoras o invasoras de cérvix como parte del tamizaje; además del diagnóstico definitivo por medio del examen histológico obtenido mediante una biopsia dirigida por colposcopia, establecido en el algoritmo diagnóstico que se lleva a cabo para todos los casos de pacientes según su estado clínico para la prevención de cáncer cérvico uterino.

Bermúdez, J., Cabezas, C., García, K. & Gaitán, S. en el estudio realizado de Pruebas de Detección del Cáncer Cervicouterino Asociado al Virus del Papiloma Humano (VPH) en mujeres atendidas en consulta externa del hospital Bertha Calderón Roque en Enero-Julio 2013, reflejó que los métodos diagnósticos utilizados para la detección del cáncer cervicouterino asociados al virus de Papiloma Humano fueron procedimientos citológicos y biopsia por conización mediante asa diatérmica o por colposcopía realizados al 100% de las pacientes en estudio; observándose la importancia de un diagnóstico en conjunto, donde se incluya la detección del ADN viral como prueba de oro.

Fontaine. V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, et al. en el estudio realizado de pruebas para ADN de VPH, se determinó, junto con citología en el diagnóstico cervicovaginal y cánceres cervicales que la PCR mejora la sensibilidad y el valor predictivo negativo en pacientes con anomalías citológicas, basado en las nuevas directrices del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos. En ese sentido, diferentes grupos han utilizado la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para su detección y tipificación.

Se han descrito diferentes protocolos con iniciadores de consenso dirigidos a los genes L1 y E6/E7, que permiten, por un lado, la detección de VPH y por otro, la tipificación de un gran número de genotipos virales prevalentes en el tracto anogenital. (Husnjak. K., Grace. M., Magdic. L. & Pavelic K., 2000).

La investigación realizada por medio del proyecto START (Screening Technologies to Advance Rapid Testing for Cervical Cancer Preventio, Utility and Program Planning), tuvo como objetivo desarrollar una prueba de VPH para sitios con recursos limitados (HC2 HPV DNA y The careHPV Tests) implementado en Nicaragua en los años 2008 -2012 para generar evidencia al MINSA a fin de decidir sobre métodos apropiados e programas de tamizaje del cáncer cervical.

Lazo, B; en el estudio realizado de tipificación del virus del papiloma humano en pacientes con citología cervical anormal atendidas en el Hospital Alemán Nicaragüense, en los meses Julio – Diciembre del 2014 se obtuvieron datos de genotipo de bajo y alto riesgo sin presentar porcentajes diferenciales de los mismos debido a que se utilizó técnica de hibridación para las muestras procesadas.

Un meta análisis realizados por investigadores de la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) publicado en el 2014 sobre los tipos virales de VPH en citologías normales y en lesiones de cuello de distinto tipo reportó que en lesiones intraepiteliales de alto grado el espectro de tipos virales es más restringido con predominio de VPH 16 (50%) y VPH 18 (20%), alcanzando juntos el 70% de la etiología de las neoplasias a nivel mundial.

Otro estudio publicado por la IARC, sobre los tipos de VPH en América Latina y el Caribe, incluyó información de más de 5,500 casos de CaCu, identificó los tipos más comunes de VPH. Los VPH 31, 45, 33, 52, 58 y 35 que en conjunto a los VPH 16 y 18 son responsables del 86.5% en la región.

II. JUSTIFICACIÓN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) constituye la principal causa asociada al cáncer cervicouterino y está presente aproximadamente en el 99% de los casos. El cáncer cervical es un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo como el nuestro, y es una de las principales causas de morbi-mortalidad en mujeres. 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 determinen tipos virales específicos logrando tener mejor entendimiento de la dinámica del virus en la historia natural de la infección por VPH.

A pesar de la implementación de la citología de cérvix para su prevención brindado por el MINSA, los índices de neoplasias cervicales siguen siendo elevados con una cobertura del 10.7% de la mujeres en riesgo (Plan Nacional de Salud 2004 - 2005). Nicaragua no cuenta con publicaciones sobre estudios de genotipificación del virus utilizando la técnica de PCR, por lo cual los genotipos más prevalente se desconocen. Por ello es fundamental realizar este tipo de investigaciones sobre el tema ya que, con la elaboración del estudio, se espera estandarizar la técnica de PCR para genotipificar al virus y contribuir al mejoramiento del diagnóstico, brindar datos epidemiológicos del virus y así permitir la prevención o el tratamiento temprano, minimizando las tasas de morbimortalidad de las pacientes que presentan este tipo de patología.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las displasias del cérvix conocidas desde hace años como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y el carcinoma infiltrante del cuello uterino (CC), están relacionadas con el virus del Papiloma Humano. Nicaragua al ser un país subdesarrollado, presenta déficit en el diagnóstico molecular debido a la falta de uso, en la mayoría de los casos, la técnica de PCR para la detección del genoma viral. La mayoría de los casos se ven afectadas mujeres en edades sexualmente activas ocasionando una morbilidad que se desarrolla producto de la generación de células asociadas al VPH.

Las pruebas de biología molecular brindan una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, por lo que en el estudio se pretende extraer el ADN viral de cepillados cervicales y genotipificar con los tipo 16,18 y 33; al Virus del Papiloma Humano en lesiones intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y lesiones intraepiteliales de alto grado (LEIAG) presentes en pacientes atendidos en consulta externa del Hospital Bertha Calderón.

IV. PREGUNTAS DIRECTRICES

¿Podrá establecerse un protocolo estandarizado para la extracción y genotipificación del VPH?

¿Cuál es la muestra ideal para la extracción y detección de ADN viral del Virus del Papiloma Humano?

¿Cuáles son los genotipos del VPH asociadas a lesiones de bajo y alto grado en las pacientes atendidas en HBCR?

¿Cuál es la frecuencia de genotipos 16, 18 y 33 presentes en las muestras de las pacientes en estudio?

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estandarizar la técnica de PCR punto final para la genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015 – Febrero 2016.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Establecer el procedimiento de toma de muestra cervical para la extracción del ADN viral.
- 5.2.2 Establecer el protocolo para la extracción y amplificación mediante PCR punto final del ADN en estudio.
- 5.2.3 Detectar los genotipos 16, 18 y 33 del Virus en las pacientes con Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Bajo Grado (LEIBG) y Lesiones Escamosas Intraepiteliales de Alto Grado (LEIAG).
- 5.2.4 Analizar mediante parámetros de desempeño los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica.

VI. MARCO TEÓRICO

7.1 GENERALIDADES

Anteriormente, los papilomavirus pertenecían junto con los poliomavirus a la familia Papovaviridae; sin embargo, con la posterior secuenciación de los genomas se observó que aunque tienen una organización genética semejante, su transcripción es diferente: unidireccional en los papilomavirus y bidireccional en los poliomavirus, por lo que el Comité Internacional de Taxonomía de los virus decidió que los papilomavirus pertenecieran a la familia Papillomaviridae. El VPH pertenece a cinco de 18 géneros de la familia, estos son capaces de producir infecciones líticas, crónicas, latentes y transformadoras en función de la identidad de la célula anfitriona.

El VPH es una partícula viral sin envoltura con genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN), circular de doble cadena, formado por una cápside de 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) cada una de estos capsómeros mide alrededor de 52 nanómetros que envuelven el genoma, los cuales facilitan el acoplamiento a proteínas virales de aproximadamente de 8 Kb. Está asociado a proteínas tipo histona que infectan con alta especificidad epitelios planos estratificados queratinizados, produciendo la transformación e inmortalización de sus células blanco asociados con la aparición y persistencias de neoplasias benignas y malignas. (Egea. A., Molina. C, 2004).

A pesar de la gran diversidad de los VPH, su organización genómica es muy conservada. Todos presentan seis genes de expresión en las etapas tempranas de la infección denominadas E (del inglés Early) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (aunque se considera que E4 es en realidad un gen tardío) y dos de expresión durante las etapas tardías del ciclo

de replicación denominadas L (del inglés Late) L1 y L2, así como una región larga de control no codificadora o RCL.

La primera región, E1, codifica para proteínas que participan en funciones reguladoras a nivel del ciclo celular, replicación del ADN y la activación del ciclo lítico. La E2 codifica para tres proteínas que funcionan como factores de transcripción; éstos son reguladores intragenómicos a través de la formación de dímeros en sitios específicos de unión. E5 participa en las fases tempranas de la infección. E6 y E7 participan en el proceso de transformación viral mediante la unión a las proteínas celulares p53 y Rb, respectivamente, desregulando el crecimiento celular e inhibiendo la apoptosis. En la segunda región la L1 con un peso molecular de 55 kd, es la proteína principal de la cápside y presenta similitudes en los diferentes tipos de VPH a diferencia de la L2, que presenta muchas más variaciones. De acuerdo con el tipo, se presentan variaciones en el tamaño y composición de nucleótidos. Finalmente una región de 1000 pares de bases RCL que no codifica y contiene los elementos reguladores de la replicación y transcripción del ADN viral.

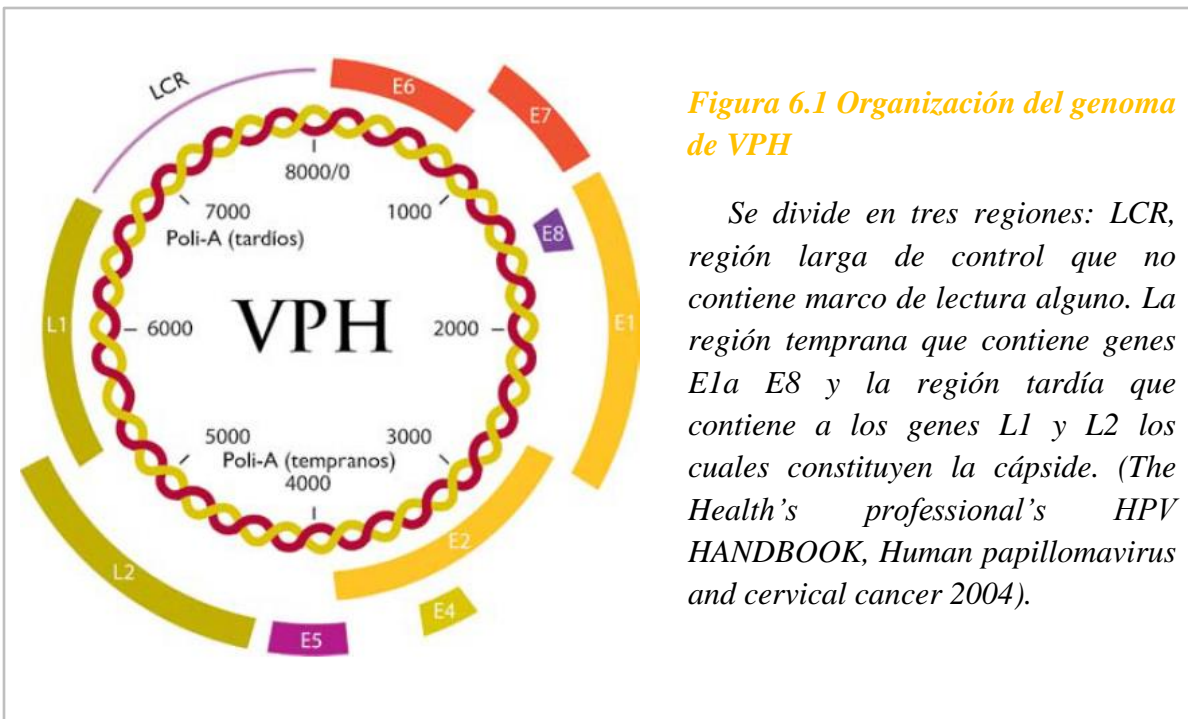


Figura 6.1 Organización del genoma de VPH

Se divide en tres regiones: LCR, región larga de control que no contiene marco de lectura alguno. La región temprana que contiene genes E1a E8 y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2 los cuales constituyen la cápside. (*The Health's professional's HPV HANDBOOK, Human papillomavirus and cervical cancer 2004*).

La capacidad oncogénica de cada uno de los VPH reside en dos productos virales: las proteínas E6 y E7, cuya expresión depende de un gran número de factores celulares y la presencia de la proteína viral reguladora E2. Todos sus genes están codificados en una sola cadena y usan un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de sus genes.

Los papilomavirus humanos son relativamente estables debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses. La característica básica de la malignidad es una anormalidad de las células, transmitidas a las células hijas, que se manifiesta por la reducción del control del crecimiento y la función celular, lo cual conduce a una serie de fenómenos adversos en el huésped, a través de un crecimiento masivo, invasión de tejidos vecinos y metástasis. El origen monoclonal del cáncer ha generado una serie de complicaciones que ha dificultado la comprensión del porqué muta una sola célula.

El ciclo de los VPH está estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido. El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina. Una vez ocurrida la infección el virus se establece dentro del núcleo de las células basales. El ADN viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. El análisis de las moléculas de ARN mensajero viral durante las distintas etapas de diferenciación de las células infectadas, demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes

tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos más superficiales, donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones que al parecer siguen fases bien definidas pero variables en la infección transitoria y en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino que se han determinado por medio de marcadores celulares.

Los VPH no presentan una fase lítica, por lo tanto se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales sufren un proceso de descamación. Cuando se estudian las lesiones histológicas y los marcadores moleculares, en un mismo tipo de lesión, puede mostrar diferentes marcadores y dentro de una misma biopsia puede haber diferentes expresiones.

7.2 GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Hasta el momento se han identificado más de 118 tipos del VPH los cuales se han clasificado en función de su potencial oncogénico y desde el punto de vista filogenético. Un nuevo aislado del VPH es considerado un nuevo genotipo o tipo si su secuencia en la región L1 del genoma difiere en más de un 10% de un tipo de VPH previamente descrito. Dentro de los tipos de VPH se han descrito subtipos y variantes en base a su variación genética, entre el 2-10% en el primer caso y un 2% en el segundo caso (Smith, et al., 2007).

Los tipos de VPH que infectan las mucosas son aproximadamente cuarenta. Se subdividen en dos grupos con diferente categoría de riesgo de desarrollo de cáncer: los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) entre los que se incluyen los VPH tipos 6, 11, 42, 43 y 44, comúnmente presentes en las lesiones benignas con mínimo riesgo de progresión maligna, y los VPH de alto riesgo (VPH-AR) que abarcan los VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, los cuales, bajo la forma de infección persistente, pueden conducir a la

transformación neoplásica. Estos virus son considerados carcinógenos clase I, según lo sugerido por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC, 2009).

La clasificación de los papilomavirus humanos, en virus de alto y bajo riesgo para el desarrollo del cáncer, se basó originalmente en que los primeros se detectaron mayoritariamente en muestras de tejido canceroso de cuello uterino y ano en comparación con los de bajo riesgo. Además se observó que los de alto riesgo podían transformar queratinocitos humanos, inducir aberraciones cromosómicas, como consecuencia del efecto de las oncoproteínas virales en el descontrol celular. En la mayoría de los estudios realizados alrededor del mundo se ha observado la persistencia del tipo 16 en casi todas las lesiones neoplásicas. Aproximadamente en el 50-80% de casos se ha encontrado VPH tipo 16 y en el 14-20% el tipo 18; otras de estas lesiones son ocasionadas por otros genotipos de alto riesgo, tales como los 31, 33, 35, 45 y 58 (Consuegra, et al, 2007). Los de alto riesgo tienen mayor inactivación de p53 y pRb y poseen una diferencia en un aminoácido (ácido aspártico en los de altos grados y glicina en los de bajo grado) que se relaciona con la afinidad por el pRb. La ausencia de VPH en el 5% de los cánceres de cuello es un factor de mal pronóstico.

En el estudio de Bosch, et al (1995) refiere que el 50% de los casos positivos lo eran para VPH 16 que predomina de forma clara en los carcinomas escamosos, 14% para el VPH 18 detectado en adenocarcinomas, 8% para el VPH 45 y el 5% para el VPH 31. Un más reciente estudio elaborado por el mismo grupo, se realizó una clasificación epidemiológica en la que se actualizaron los grupos en relación al riesgo (Muñoz, et al., 2003). La prevalencia del VPH 16/18 combinados en lesiones de cáncer de cuello uterino es levemente mayor en Europa, América del Norte y Australia (74 a 77%) que en África, Asia, América del Sur y América Central (65 a 70%) (Clifford, et al., 2006).

7.3 EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

El SB acepta que en una muestra adecuada exista moco endocervical; sin embargo, esto puede no ser suficiente ya que este moco puede cubrir una lesión y por consiguiente a las células neoplásicas que pueden no ser aún obtenidas si el moco es abundante. Otro factor es el exceso de exudado que diluye y oscurece la muestra. El tamaño y forma del cérvix, y el sitio donde se encuentra la zona de transformación (ZT). Para que una muestra sea adecuada, según el SB deben existir células endocervicales (CE), ya sean normales o metaplásicas (CM); esto ha fomentado el desarrollo y perfeccionamiento de instrumentos que puedan obtener muestras con estas células, generalmente cepillo endocervical y espátula para la citología.

La calidad, cantidad y condiciones de almacenamiento de las muestras clínicas son factores que pueden afectar la sensibilidad de los diferentes métodos de detección del genoma viral del VPH. Los métodos que no requieren la extracción de los ácidos nucleicos para su realización, como es el caso del test de la captura de híbridos 2, Hybrid Capture® hc2 HPV DNA Test y hc2 High Risk DNA Test - de Digene Corporation por ejemplo, no son tan dependientes de estas variables.

El hisopo que ha sido utilizado por muchos años puede ser un instrumento útil; sin embargo, es el que menos material adecuado obtiene. Además tiene varios inconvenientes: es de algodón absorbente y puede secar de inmediato el material, la punta es muy gruesa y sólo en orificios muy amplios podrá tomar muestra endocervical; puede ser útil cuando la ZT está por fuera del orificio, como en el ectropión y cuando el orificio es amplio, transversal y con ZT visible.

La obtención de ADN adecuado para llevar a cabo estudios con la PCR a partir de muestras parafinadas, depende de múltiples variables que actúan sobre los tejidos antes, durante y después de la fijación, que se encuentran frecuentemente fuera del control del investigador. El daño causado al ADN en los especímenes fijados en formalina y parafinados son en última instancia, determinados por las condiciones propias de fijación-parafinación-almacenamiento a las que son sometidas. La amplificación de las muestras parafinadas se puede ver afectada por múltiples factores, uno de ellos puede ser el tiempo de fijación al que han sido sometidos los tejidos. Ha sido reportado que el tiempo de fijación, pueden originar bajas importantes en la eficiencia de amplificación después de 1 semana e inclusive 24 horas según los autores (Frank et al., 1996).

La utilización de muestras de archivo, es importante para la realización de estudios retrospectivos. Sin embargo, el proceso de fijación puede afectar considerablemente a la calidad de los ácidos nucleicos. Este tipo de muestras es adecuado para sistemas basados en la amplificación de pequeños fragmentos de ADN (ITC, 2006).

El Cepillo cervical es eficiente al obtener células de la ZT ya que al girarse no más 15°, se logra obtener material adecuado de toda la circunferencia, el girarlo más puede provocar un sangrado y diluir la muestra. Las muestras obtenidas con citocepillo fueron superiores a las obtenidas con el hisopo de algodón o espátula de Ayre en un estudio prospectivo donde se evaluó el citocepillo, hisopo de algodón y espátula de Ayre en 1188 pacientes (Velázquez, 1997).

Un estudio comparativo en Uruguay 2007, sobre la efectividad de la varilla (espátula) y citocepillo demostró que este último es mayor que el de la varilla, 9 muestras satisfactorias adicionales por cada 100. La utilización de un equipo adecuado permite obtener una muestra satisfactoria, diagnosticar correctamente los casos y evitar la recurrencia para realizar otra toma de muestra; además sugieren el uso de citocepillo en

pacientes mayores o iguales a 30 años de edad, donde la frecuencia de neoplasias epiteliales en su estudio fue del 93%.

La evaluación de los distintos tipos de muestras para análisis molecular pretende definir la muestra ideal que no solo reduzca significativamente el número de falsos negativos, si no que su obtención sea relativamente sencilla y de forma rápida. Una de las causas de falsos negativos se debe a la falta de contenido endocervical en la muestra, por ello, el uso del citocepillo para la obtención de muestra tiende a generalizarse cada vez más.

En la actualidad se han desarrollado diferentes medios de transporte de muestra comerciales entre ellos PreserCyt® (Cytoc Corporation, Estados Unidos de América) y el medio Specimen Transport Medium™ - STM (Digene Corporation, Estados Unidos de América). En principio cualquiera que sea la naturaleza del medio de transporte sea comercial o implementada dentro de los propios laboratorios de investigación, deben conservar la integridad de las células y, por tanto, de las proteínas, del ADN viral y del ARN los cuales permitan, a partir de una misma muestra, realizar el análisis patológico y los análisis moleculares de detección del VPH.

Los diluyentes isotónicos tales como la solución salina o solución salina tamponada con fosfato se utilizan sistemáticamente para preparar suspensiones de células microbianas. Las sales contenidas en estos líquidos de suspensión proporcionan un medio isotónico para mantener la integridad y viabilidad de las células con un valor de pH fisiológico. El cloruro sódico proporciona protección osmótica a las células microbianas. El buffer fosfato salino 1X y timerosal al 0,05% se utiliza como medio de transporte para cepillados cervicales, con respecto a la calidad, las muestras cumplen los requerimientos mostrando alta sensibilidad con los iniciadores MS3/MS10 del gen de β -globina que detecta menos de 10 ng de ADN genómico (Colombia, 2010). Sin embargo el timerosal además de ser un agente antiséptico y antimicrobiano se ha registrado sus propiedades tóxicas por lo que su uso es limitado.

La utilización de PBS en muestras de hisopado/citocepillos durante dos horas a temperatura ambiente sin ningún inhibidor antimicrobiano ha resultado satisfactorio (Quintero, 2008).

Las técnicas de detección del genoma viral mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requieren el aislamiento previo de los ácidos nucleicos, ADN y/o ARN. En la actualidad, existen múltiples sistemas de extracción de ácidos nucleicos, muchos de ellos disponibles comercialmente (QIAmp DNA kit, Qiagen, Hilden, Germany; DNA isolation Kit, Roche Applied Science, Suiza, etc.). Como en todo análisis la etapa pre-analítica representa un paso importante y es la garante de que las posteriores etapas se realicen con éxito, en este aspecto el método de extracción de ácidos nucleicos es un punto crítico, ya que un bajo rendimiento del método utilizado puede disminuir significativamente la sensibilidad de las técnicas moleculares, tanto desde el punto de vista de la detección del VPH como del análisis de infecciones por múltiples tipos del VPH u otras infecciones. En la elección de un método de extracción se requiere del conocimiento y experiencia de los mismos, debido al avance de la biología molecular la elección y comparación se vuelve un tanto compleja debido a la variedad de protocolos y de sistemas de amplificación existentes en el mercado. Por lo general, la gran ventaja que ofrecen los kits de extracción de ADN es la reducción sustancial del tiempo y laboriosidad de los procedimientos con lo que disminuyen los riesgos de contaminación y mejor calidad de la muestra.

7.3.1 Cuantificación de ADN

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN. La absorción de UV de ADN es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo

tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de ADN.

Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm. Para determinar pureza, se utiliza la razón de ADN/proteínas. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. Un buen ADN (calidad y pureza) es aquel cuyo A260/A280 es de 1.8 a 2.0 (Thermo Scientific, 2012)

La principal ventaja de trabajar con el espectrofotómetro NanoDrop Lite es que la medida se lleva a cabo a partir de 1 ó 1,5 µl de muestra sin ayuda de ningún tipo de cubeta ya que la muestra se pipetea directamente sobre la superficie de medida.

7.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

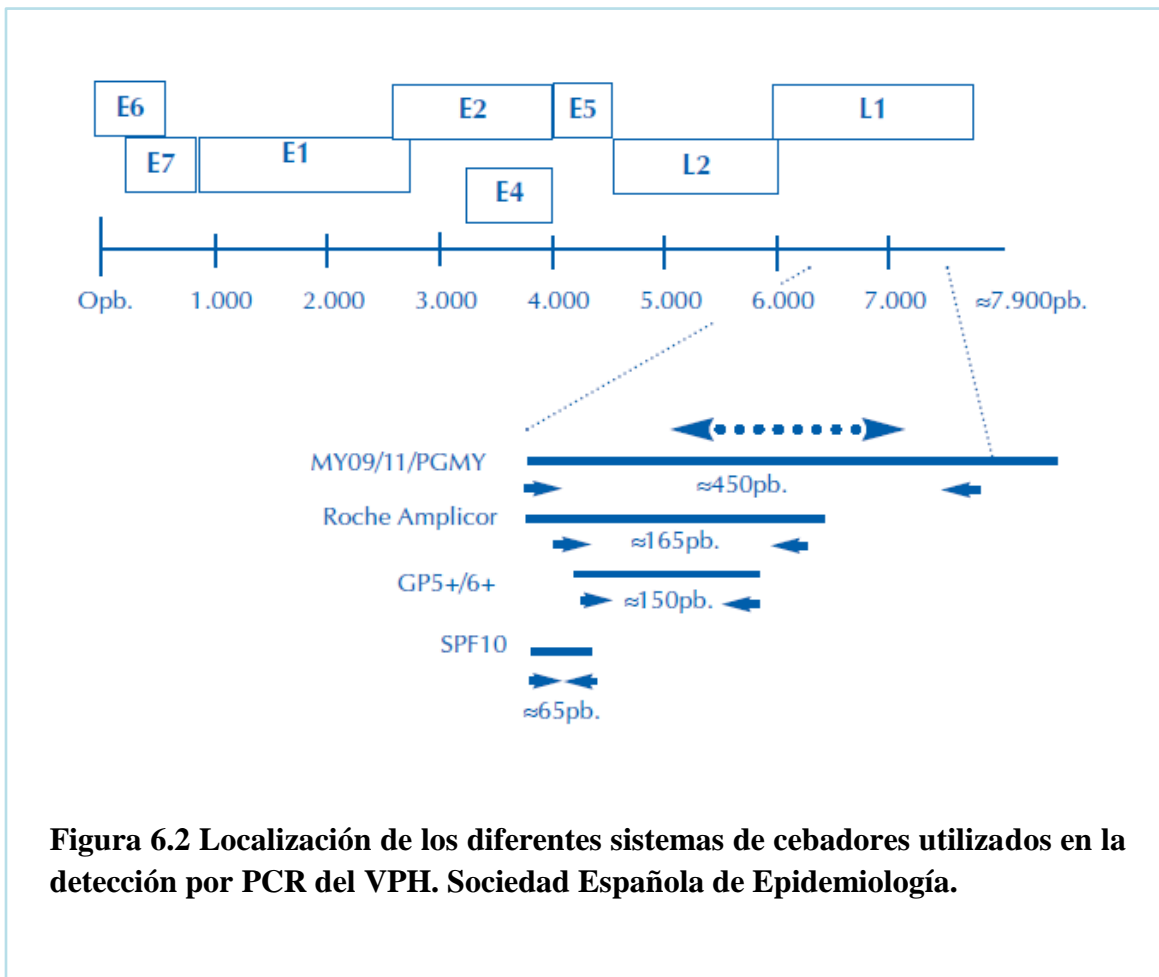
A principios de la década de los 80, el desarrollo de tecnologías del ADN para la identificación del VPH en células exfoliadas del cérvix, propició un gran auge en todo lo referente al pronóstico, diagnóstico, tratamiento y combate contra el cáncer cervicouterino, gracias a éstos métodos los estudios epidemiológicos pudieron confirmar que la mayoría de las asociaciones de riesgo observadas, se deben en gran medida a la persistencia del ADN del virus de papiloma humano. Este hallazgo ha tenido una importancia crucial, debido a que se ha demostrado que es necesaria la presencia de los genotipos de VPH de alto riesgo para el desarrollo de todos los casos de cáncer cervicouterino diagnosticados en el mundo. Por tanto, la clave para una acertada evaluación de riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino es la información precisa sobre el virus de papiloma humano. Dada la importancia de la infección por VPH como factor etiológico de éste cáncer, la detección del

mismo juega un papel determinante en la práctica clínica de las pacientes con lesiones pre-invasivas o hasta como complemento de la citología.

La infección persistente con tipos oncogénicos del virus de papiloma humano (VPH) ha sido demostrada como un factor necesario para el desarrollo y progresión de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y del cáncer invasor. Considerando dicha asociación, se ha propuesto la incorporación de pruebas de detección viral altamente sensibles y específicas en los programas de tamizaje, como son las técnicas de detección de ADN. La introducción de métodos moleculares en el diagnóstico del VPH y la caracterización de tipos y variantes ha sido de gran utilidad en el conocimiento de la infección, dadas las limitaciones derivadas de la ausencia de sistemas de cultivos *in vitro* del VPH. En la aplicación de los métodos moleculares para la detección y caracterización del VPH hay que tener en cuenta la variación genética entre los diferentes tipos y variantes. Los métodos aplicados a la identificación de la infección deben ser diseñados de forma que sean capaces de detectar con una elevada sensibilidad el mayor número de tipos.

Paralelamente, los métodos aplicados al tipado y caracterización deben ser lo suficientemente específicos para discriminarlos. La mayor parte de los métodos de identificación directa de infección por VPH están basados en la detección del ADN del virus, aunque también se han desarrollado sistemas basados en la detección del ARN. De manera ideal, un método para la detección del ADN del VPH debe ser capaz de detectar e identificar la presencia de múltiples tipos del VPH. Debe además realizarse con facilidad, con alta reproducibilidad y una elevada especificidad y sensibilidad lo que proporciona un resultado con alta confiabilidad. Cabe destacar que estos métodos son implementados como parte del algoritmo en el diagnóstico del CACU, tanto la citología como estudio de ADN viral de manera integral minimizan lo números de casos.

La técnica de PCR es el método de amplificación de secuencias diana más frecuentemente utilizado. En la detección y tipado del VPH se han utilizado diferentes diseños de sistemas de PCR que incluyen los específicos de tipo y los sistemas denominados de amplio espectro. Las PCR específicas de tipo utilizan cebadores que han sido diseñados para detectar un tipo determinado del VPH; por tanto, la detección de diferentes tipos implica la realización de múltiples reacciones de PCR.



7.4.1 Templado

Una de las características más atractivas de la PCR es que la cantidad y calidad de la muestra de ADN sujeta a amplificación no necesita ser alta. Un lisado celular crudo o especímenes con una longitud promedio de unos pocos cientos de pares de bases son usualmente adecuadas para una amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización.

7.4.2 Sistemas de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μM . Altas concentraciones de primer pueden promover “mispriming” y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.

Los sistemas de PCR están diseñados en su mayoría en la región L1, dado que es una de las regiones más conservadas dentro del genoma de los VPH. Existen tres diseños diferentes de cebadores consenso. En primer lugar, están aquéllos que incluyen una pareja única de cebadores, diseñados sobre una región conservada, pero que sólo se “aparean” completamente con algunos tipos del VPH. Para compensar los desapareamientos, la PCR

se realiza a bajas temperaturas de anillamiento. Los cebadores Primer General (GP) 5+/6+ son un ejemplo representativo (Antón Pascual JC, Salas Trejo D). El segundo tipo de cebadores consenso incorpora varias parejas de cebadores, que contienen una o más posiciones degeneradas para compensar las variaciones intertípicas en los lugares de la secuencia a los que se unen los cebadores. Entre ellos cabe destacar el sistema MY09/MY11. El tercer diseño consiste en combinar una serie de parejas de cebadores diferentes que se unen en las mismas posiciones del genoma. A menudo contienen inosina en sus secuencias, ejemplos de este tipo de cebadores son PGMY y SPF10.

Otros sistemas de PCR de amplio espectro han sido diseñados en diferentes regiones del genoma como E1, aunque su uso no se ha generalizado en los laboratorios.

Es importante considerar que, en los sistemas de PCR basados en la utilización de cebadores degenerados, la eficacia de la amplificación de los diversos tipos no es igual y va a depender del grado de identidad de la secuencia del VPH y del cebador. Así mismo, en muestras con múltiples tipos de VPH, la amplificación de los mismos va a depender de la carga viral de cada uno de ellos, pudiendo quedar enmascarados aquéllos con cargas virales bajas.

7.4.3 Enzima

Un rango de concentración recomendado para *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer CETUR) es entre 1 y 2.5 unidades (SA = 20 unidades/pmol) por 100 µl de reacción cuando los otros parámetros son óptimos. Sin embargo, los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a la secuencia blanco o los primers. Cuando se optimiza un PCR, se recomienda probar rangos de concentración de enzima de 0.5 a 5 unidades/100 µl.

Si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan productos no específicos, y si es muy baja se formara una cantidad insuficiente del producto deseado. La técnica de PCR en tiempo real se ha introducido en los últimos años en el diagnóstico molecular del VPH como herramienta para la determinación cuantitativa de la carga viral así como para el diagnóstico de la infección.

7.4.4 Concentración de Magnesio

Es benéfico optimizar la concentración del ión magnesio, ya que afecta: el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la formación de dímeros de primer y la actividad y fidelidad de la enzima. La *Taq* polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre el total de la concentración de dNTP. La presencia de EDTA u otros quelantes en el stock del primer o del templado puede alterar la concentración óptima aparente de magnesio.

7.4.5 Otros componentes de la reacción

Un buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8). Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C y un pK_a de -0.021/°C sin embargo el verdadero pH de una buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador. Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la *Taq* polimerasa.

La gelatina o la albúmina bovina (100 µg/ml) y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 (0.05 a 0.1%) son incluidos para ayudar a estabilizar la enzima, sin embargo muchos protocolos trabajan bien sin estos componentes.

El enhancer o secuencias potenciadoras, son secuencias reguladoras de ADN que, cuando se unen por las proteínas específicas denominadas factores de transcripción, mejoran la transcripción de un gen asociado. Las secuencias potenciadoras actúan sobre los genes en la misma molécula de ADN.

La utilización de controles internos en las reacciones de amplificación, como la detección de genes constitutivos (β -globina, β -actina) para evaluar la calidad del ácido nucleico extraído, constituye una herramienta de gran utilidad.

El análisis de los productos amplificados por PCR se lleva a cabo mediante la digestión de los mismos con diferentes enzimas de restricción, originando patrones específicos para cada uno de los tipos del VPH. El protocolo descrito por Bernard HU y Cols en 1994 ha sido el más utilizado, y está basado en la digestión del fragmento amplificado (450 pb.) por el sistema de cebadores MY09/11 con siete enzimas de restricción: Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I y Sau3AI. Presenta la ventaja con respecto a la secuenciación de poder identificar la presencia de infecciones múltiples, si bien en muchos casos no es posible identificar los tipos concretos implicados en la mezcla, fundamentalmente cuando hay más de dos tipos en la misma.

7.4.6 Etapas

Con la PCR se realiza *in vitro* el proceso de replicación del ADN. Está basado en la acción de la polimerasa, que como se sabe es la enzima que dirige la síntesis de ADN, y desde una cadena simple de ADN sintetiza la complementaria. Para ello necesita al menos una pequeña fracción de cadena doble de ADN para iniciar la síntesis. Esto hace posible, si de forma voluntaria le proponemos una pequeña fracción de oligonucleótidos que sean complementarios de una porción, se unirá después de la desnaturalización de la doble cadena y mediante el crecimiento hacia el extremo 3' del ADN por aposición de los nucleótidos correspondientes suministrados y, a través de la acción de la polimerasa, se hace la amplificación del fragmento deseado.

Desnaturalización: La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto se reduce el rendimiento el producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima.

Alineamiento: La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers depende de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers. Debido a que las DNA polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango

de actividad de las enzimas varia en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados.

Extensión: La tercera reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varia de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima.

7.4.6.1 Número de ciclos

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés. El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados. Pocos ciclos dan como resultado un bajo rendimiento del producto.

7.4.7 Termocicladores

El termociclador es el aparato que permite llevar a cabo de forma automática y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura necesarios para la PCR. Los primeros termocicladores eran robots que movían una gradilla de tubos entre varios baños termostáticos a tiempos preestablecidos. Los actuales constan, básicamente, de un bloque de metal que puede ser calentado o enfriado, con posibilidad de programar las temperaturas y los tiempos.

Existen multitud de termocicladores en el mercado, aunque las características principales son las siguientes: Constan de un bloque térmico, cuyo calentamiento y enfriamiento se produce a gran velocidad, gracias al denominado sistema Peltier. Las rampas de subida y bajada de temperatura son importantes para trasladar los protocolos entre termocicladores, y uno de los factores de falta de reproducibilidad, lo que hace que deban ajustarse de nuevo las condiciones de tiempos y temperaturas.

Actualmente, están diseñados mayoritariamente para tubos de 0,2 ml aunque aún existen también para 0,5 ml. Es importante el perfecto ajuste del tubo en el bloque. Por ello, se recomienda utilizar los de la misma marca que el fabricante. El rango de temperaturas suele abarcar de 4°C a 110°C, aunque el rango habitual debe ser de 15°C a 95°C. No debe sobrecargarse al aparato con temperaturas extremas para prolongar su supervivencia. Los 4°C se utilizan para refrigerar muestras tras una PCR, pero 15°C también es una temperatura apta para ello. Respecto a llegar a 100°C o más, tampoco es aconsejable, al menos, de forma habitual. Es preferible emplear termobloques para llevar a cabo esta labor.

Existen bloques que permiten ajustar distintas temperaturas en función de las zonas del mismo. Se dice que tienen función gradiente. Son muy útiles cuando se realiza ajuste

continuo de programas de PCR, especialmente de temperaturas de hibridación, o cuando se necesitan realizar diversos protocolos de forma simultánea. Los termocicladores más antiguos no la poseen, pero es un elemento indispensable para evitar la evaporación de la muestra, al contactar totalmente con la tapa del tubo. El Software para programación de tiempos y temperaturas en el que puede ajustarse también la velocidad de subida y bajada de temperaturas, es denominado, rampas.

7.4.8 Electroforesis

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.

Dependiendo del objetivo de la electroforesis se pueden utilizar diferentes soportes, siendo los más utilizados los geles de agarosa y los de poliacrilamida. Hay varios factores que afectan la tasa de migración del ADN durante la electroforesis, estos son: · Tamaño de la Molécula · Concentración del Soporte (Agarosa, Poliacrilamida etc.) · Conformación del ADN · Voltaje aplicado · Dirección del campo eléctrico · Composición en bases del ADN y temperatura del sistema · Presencia de colorantes intercalantes · Composición del buffer de electroforesis para un determinado medio, a mayor voltaje, más rápidamente se mueven las partículas y menos tiempo se requiere para la separación de éstas, pero hay valores óptimos de voltaje que dependen de la naturaleza de cada medio. Voltajes altos generan mucho calor, lo cual podría deshidratar el medio y perder su fluidez. En cuanto a la composición del buffer de electroforesis, medios con bastante absorción o interacción con las sustancias a separar y medios con poca o ninguna interacción con dichas sustancias. La

retención disminuye la velocidad de las partículas lo que conlleva el uso de voltajes altos o tiempos muy largos para que ocurra la separación.

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis es la migración de solutos iónicos en una matriz tamponada sometida a un campo eléctrico; las partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), dependiendo de la combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Puesto que la matriz actúa como un filtro, los fragmentos menores migran más rápidamente en dirección al polo positivo, mientras que los de mayor longitud migran más lentamente. La agarosa se extrae de algas rojas, gelifica a temperaturas comprendidas entre 32 - 45 °C y funde a temperaturas entre 80 - 95 °C. Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN.

Buffer de carga: Proporciona densidad a la muestra, permitiendo que caiga al fondo del pozo. A su vez, este posee un agente que permite visualizar el frente de corrida. (Azul

de Bromofenol). Se usa aproximadamente en una proporción 10% del volumen de muestra a cargar.

Existen diferentes colorantes con propiedades distintas que se mencionan a continuación;

Azul de bromofenol: Un compuesto coloreado y con carga, utilizado para comprobar el progreso de la electroforesis. En la electroforesis, por su menor tamaño, se mueve más rápido que las proteínas o que la mayoría de moléculas de ADN (siempre que éstas sean superiores a 300 pb), es decir, marca el "frente de avance". Puesto que su color azul-violeta es bien visible, permite detener la electroforesis con la confianza de que las moléculas de proteína o ADN no se hayan salido del gel.

Bromuro de Etidio: Es un compuesto intercalante, es decir, que tiene afinidad para unirse al DNA, pues se introduce entre sus bases apiladas. Esto se debe a su geometría plana y su estructura aromática, que interacciona favorablemente con el interior hidrófobo de la doble hélice. En menor medida, interacciona también con ADN monocatenario.

Su utilidad deriva asimismo de su fluorescencia, exaltada al encontrarse en un entorno hidrófobo, es decir, al estar unido al ADN. Se excita con luz ultravioleta de onda corta, 254 nm, y emite su fluorescencia como luz visible, de color rosado-anaranjado. Se puede bañar el gel tras la electroforesis en una disolución de bromuro de etidio, o bien incorporar éste a la disolución de agarosa con la que se prepara el gel. Se incluye en bajas concentraciones en el gel (0.5ug/ml) o en el buffer. Sin embargo debe manipularse con cuidado por sus propiedades cancerígenas y mutagénicas.

Azul de Coomassie: Se trata de un compuesto coloreado que se une a todo tipo de proteínas. Es poco soluble en agua, por lo que habitualmente se disuelve en una mezcla de

agua, metanol o isopropanol y ácido acético. Tras realizar la electroforesis, el gel se "tiñe" sumergiéndolo durante unos 30 minutos en la disolución de Coomassie para que éste penetre y se fije a las proteínas. Dado que todo el gel se impregna del colorante, es preciso después realizar una destinción, lavando varias veces con disolvente libre del colorante.

Como buffer de electroforesis y para la preparación del gel puede utilizarse opcionalmente TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA). El TAE tiene una menor capacidad de amortiguación que el TBE, y puede resultar en una acidificación del medio si la electroforesis se desarrolla durante un periodo muy prolongado, pero funciona muy bien con tiempos normales de electroforesis, además tiene una mayor capacidad de resolución que el TBE para tamaños grandes de ADN.

El TAE es mejor para el análisis electroforético de fragmentos grandes de ADN (900 – 2000bp) ya que corren más rápido y tiene mayor capacidad de discriminación en un gel de agarosa a 0.8%. Mientras que en TBE para fragmentos pequeños de ADN (100 – 500bp) corren más rápido y tiene mayor capacidad de discriminación en gel de agarosa al 2%. El TBE es más estable y tiene una capacidad tampón más alta que el TAE. Respecto al reciclaje: el TAE no aguanta más de 3 corridas de electroforesis seguidas sin alterar sus propiedades, mientras que el TBE dura 3 o 4 días independientemente de las corridas de electroforesis realizadas. Este último, tiene una interacción pegajosa con la agarosa, lo que provoca una recuperación baja del ADN.

7.5 ESTANDARIZACIÓN

Los laboratorios de Salud Pública en busca del proceso de mejoramiento continuo han desarrollado un sistema de aseguramiento de la calidad, operativizado a través del trabajo en conjunto, dentro de este proceso es fundamental la validación de las técnicas

analíticas de acuerdo con los requerimientos de la Norma Técnica Colombiana NTC ISO 17025, es decir las pruebas deben cumplir con los diferentes requisitos establecidos.

Definición: La estandarización es ajustar un método analítico a determinadas normas y formas comprendiendo los siguientes parámetros de desempeño: Montaje, Validación, Cálculo de atributos y Cartas de control.

7.6 Parámetros estadísticos de desempeño

7.6.1 Montaje

Es establecer un procedimiento analítico, en esta etapa se definen los elementos del método a ensayar, lo que incluye los siguientes atributos:

- a. Procedimiento detallado de análisis, asimilación del método
- b. Verificación de equipos, reactivos y elementos del laboratorio
- c. Ensayo de respuesta o señal
- d. Concentraciones más bajas y más altas detectadas en la muestra
- e. Ensayo de reproducibilidad

7.6.2 Validación

Es un proceso experimental, que permite evaluar o determinar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, cuyas características de diseño cumplen con los requerimientos metodológicos y de resultados para la aplicación analítica propuesta; que involucra el desarrollo de un protocolo.

7.6.3 Cálculo de los atributos

Son los que se derivan del proceso de validación para un método analítico no cuantitativo: Sensibilidad, Especificidad, Confiabilidad Diagnóstica, Límite de Detección, reproducibilidad y repetibilidad.

7.6.3.1 Sensibilidad y Especificidad

No es posible afirmar que un método analítico no cuantitativo sea bueno sólo porque pueda diferenciar las poblaciones de testigos positivos verdaderos y de los testigos negativos verdaderos, es decir que tenga una adecuada Selectividad. Para que un método analítico no cuantitativo se considere validado es necesario además, que genere de manera correcta respuestas analíticas positivas y respuestas analíticas negativas. Por lo tanto la Sensibilidad y la Especificidad son dos características importantes para validar en método analítico.

La especificidad analítica se define como la capacidad de un ensayo para distinguir el agente objeto de estudio de otros agentes infecciosos. Dicha capacidad se determina mediante el análisis de los patógenos genéticamente relacionados entre sí y el material clínico obtenido pueden imitar a (o confundirse con) aquella para la que se ha diseñado la prueba. La Especificidad es la probabilidad de que la respuesta analítica (y por ende la prueba) resulte negativa debido a que en la muestra estudiada no existe físicamente el sustrato o sustancia de interés diagnóstico o se encuentra por debajo de los límites de detección. Es decir, la especificidad valora la utilidad de una prueba con el fin de identificar a los no enfermos (tasa o proporción de verdaderos negativos): $d/(b + d)$. Es oportuno recordar que d es el número de verdaderos negativos y b = número de falsos positivos.

La sensibilidad analítica (o límite de detección) se define como la cantidad más pequeña de un agente detectado por el ensayo, y puede representarse como el número de copias del genoma, de dosis infecciosas, de unidades que integran la colonia, de unidades que forman la placa, etc. del agente que puede detectarse y distinguirse a partir de un resultado cero. Para determinar la sensibilidad analítica se utiliza una dilución de punto final hasta que el ensayo ya no pueda detectar el blanco en estudio en más del 5% de las réplicas. Los fragmentos clonados de los productos de la PCR en estudio se pueden usar como muestras estándar, bien para ADN o como dianas de ARN, siendo este transcrito *in vitro* al ADN. Las estimaciones de la sensibilidad analítica pueden variar sustancialmente para el mismo ensayo cuando se utilizan diferentes muestras como matrices. Cuando se pone en marcha una serie de diluciones, es importante utilizar un diluyente que tenga cualidades similares a la muestra matriz, por ejemplo diluyendo semen positivo en semen negativo y no en tampón. La Sensibilidad es la probabilidad de que la respuesta analítica (y por ende la prueba) resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés diagnóstico en los límites de detección o por arriba de ellos.

En el caso de muestras, la Sensibilidad se define como la probabilidad de que un individuo enfermo tenga un test positivo: $a/(a + c)$. Donde a = número de verdaderos positivos y c es el número de falsos negativos. La sensibilidad indica la proporción del total de enfermos que el test es capaz de detectar. De esta manera, la sensibilidad nos indica la capacidad de una prueba diagnóstica para identificar una enfermedad.

La citología es específica para detectar cáncer cervical y NIC de alto grado, pero es mucho menos específica para diagnosticar NIC de bajo grado. En contraste a su alta especificidad para detectar alto grado de NIC y cáncer invasor, el PAP no es muy sensitivo, pues los resultados falsos negativos ocurren entre el 8 y 50% (Riqliart y Selvaggi, 1989) Cuando los frotis de PAP fueron introducidos por Papanicolaou las muestras eran tomadas solo del fondo de saco vaginal y prontamente pareció que este método era inadecuado

resultando una proporción alta de falsos negativos, Ayre en 1947 reportó el uso de espátula de madera para raspar la superficie del cérvix para obtener las células del área en que se inician y desarrollan las NIC y cánceres muy conocida como la Zona de Transformación, la muestra puede ser tornada con un aspirador endocervical, un hisopo de algodón humedecido con solución salina o con escobilla endocervical (citobrush). Con esta última se obtiene 10 veces más células endocervicales que con el hisopo de algodón, mejorando la eficacia del PAP.

Estudios que usan una combinación de espátula de madera y escobilla endocervical reportan alrededor de 20% de falsos negativos. Otros factores importantes para reducir la proporción de falsos negativos son la fijación rápida de células para prevenir cambios secundarios artificiales debidos a la sequedad por aire y también el uso de un laboratorio citológico con normas rigurosas de control de calidad.

Para los cambios celulares menores, los médicos generalmente recomiendan repetir la citología vaginal en 3 a 6 meses, esto dependerá del algoritmo establecido en las unidades de salud. Existen alteraciones morfológicas, que en conjunto caracterizan a las células tumorales malignas. Estas alteraciones se conocen como criterios de malignidad (Frost, 1979). Sin embargo, es indispensable precisar que no existe un signo morfológico patognomónico de cáncer. Por otra parte, no siempre todos los signos de malignidad se encuentran en cada célula cancerosa. Por estos hechos la citología, como método de colaboración diagnóstica, requiere de gran experiencia y ponderación.

Gutiérrez (2011) afirma: “La citología cervical no es una técnica diagnóstica, las evidencias científicas coinciden en que posee una sensibilidad y especificidad limitada 50-60%, debido a que únicamente reporta si hay algún cambio citopatológico en las células, pero no confirma si la anormalidad citología es provocada por la presencia de algún genotipo de VPH en particular, específicamente los relacionados con cáncer cervicouterino.

Por tanto, aunque una sola prueba negativa de Papanicolaou de alta calidad indique un riesgo bajo de cáncer, por lo general es importante repetir la prueba para poder detectar las lesiones NIC II/III”.

Los protocolos que emplean PCR se caracterizan por ser más sensibles y específicos y permiten la detección de infecciones latente sub-clínica y activa por VPH, así como determinar el o los genotipos específicos de VPH que causan dicha infección. La principal utilidad de las pruebas de detección de VPH, es que pueden conducirnos a una detección temprana de lesiones de alto riesgo y recurrencia post-tratamiento, no identificadas por citología; permiten especiar los intervalos del tamizaje para las mujeres que no presenten infección por VPH de alto riesgo y finalmente, invertir mejor los recursos para el seguimiento de las pacientes que conforman los grupos de riesgo.

Hasta la fecha las técnicas basadas en la detección del ADN del VPH son las más precisas, sensibles y específicas en la detección de lesiones pre-malignas y han demostrado su utilidad en la disminución tanto de la mortalidad como de la morbilidad por cáncer cervicouterino (UNAM-INcan, 2006).

7.6.3.2 Eficacia diagnóstica

El valor global de la prueba o eficiencia de la prueba indica la proporción de resultados válidos entre el conjunto de resultados. Es decir el porcentaje o la probabilidad de que un paciente sea correctamente clasificado por la técnica, o la probabilidad de que esa prueba diagnóstica acierte en sus conclusiones. Es la probabilidad de que en una serie de muestras, se detecte correctamente el metabolito, reactivo o sustancia de interés diagnóstico debido a que ocurrió una adecuada reacción o interacción del reactivo o reactivos con el

sustrato generando una respuesta analítica positiva. Su estimación está basada en los valores predictivos positivo y negativo.

7.6.3.3 Repetibilidad y Reproducibilidad

La repetibilidad es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo equipo de medida y durante un corto intervalo de tiempo (ejemplo, realización de muestras por duplicados). Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición (en el mismo run). En el caso de que las condiciones establecidas permitan cambiar (operador, laboratorio, aparato, etc.) y la diferencia entre dos resultados de ensayo pueda esperarse dentro de una determinada probabilidad (95%), a este valor se le llama reproducibilidad.

La reproducibilidad es un parámetro importante para la precisión del ensayo. La reproducibilidad se determina en varios laboratorios utilizando una prueba idéntica (protocolo, reactivos y controles). Cada uno de al menos tres laboratorios ensayan el mismo conjunto de muestras (un mínimo de 20 muestras), con alícuotas idénticas para cada uno de los laboratorios. Este esfuerzo proporcionará estimaciones de la solidez del ensayo. Las estimaciones de la reproducibilidad son esenciales antes de que pueda considerarse su utilización válida en otros laboratorios. Es la precisión en las condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, pero con diferentes operadores, equipos de medida, en diferentes días, etc. Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición (en diferentes corridas).

7.6.3.4 Límite de detección

Límite de detección experimental de la PCR: se define como la concentración más baja de unidades genómicas por reacción del ácido nucleico diana que puede ser detectada de forma reproducible con un 95% de probabilidad.

Conociendo la Confiabilidad Diagnóstica es posible estimar el límite de detección del método analítico diluyendo la muestra de análisis a concentraciones susceptibles de encontrarse en condiciones de trabajo. El límite de detección será la mínima cantidad de sustrato en una muestra, que bajo las condiciones de operación establecidas, sea capaz de generar una respuesta analítica positiva en el método analítico. El límite de detección del Método de Medición se evalúa haciendo diluciones sucesivas de concentraciones conocidas de la sustancia de interés, como mínimo por quintuplicado y determinando la respuesta analítica. El límite de detección será aquella concentración del sustrato a estudiar donde las respuestas analíticas de al menos el 5% de los ensayos sean negativas.

La detección de ADN de VPH se utiliza con frecuencia como discriminante pronóstico en los casos de citologías ambiguas (ASCUS, CIN1, discariosis leve...). Las conclusiones de estudios relacionados, incluyendo entre otros a un gran ensayo aleatorio, indican que la detección viral en casos de ASCUS predice la coexistencia de una lesión de alto grado con mayor sensibilidad y con mejor relación coste beneficio que la repetición de la citología. Estudios controlados sobre la actitud a seguir en estos diagnósticos indican que el seguimiento pasivo con repetición de las pruebas de citología y de detección de VPH a los 12 meses asegura el diagnóstico de lesiones de alto grado subyacentes sin riesgos significativos para la paciente. En investigaciones que han completado seguimientos de 10 años, la detección única de ADN viral en el momento del ingreso en el estudio predijo el 60% de las lesiones de CIN 2+ que se diagnosticaron en los diez años siguientes. La capacidad de predicción de una prueba única de citología convencional fue del 30%. Las

sociedades científicas están aplicando estas conclusiones para la actualización de los protocolos clínicos rutinarios.

7.6.4 Cartas de control

Es el procedimiento interno que se realiza para verificar que el método cumple con los requisitos establecidos, permitiendo llevar un registro diario del procedimiento. La estandarización se puede alcanzar al poseer una documentación escrita, en la que se describe la manera correcta de realizar las actividades, por la cual se rige todo el recurso humano que labora en determinada técnica. Los documentos crean un sistema homogéneo de análisis de laboratorio o emisión de resultados de conocimiento para el personal que participa en la elaboración de un producto o proveen un servicio.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Área de estudio

El estudio se realizó en el Hospital Bertha Calderón Roque, Managua; en el periodo Noviembre 2015-Febrero 2016

Tipo de estudio

Cuasi-experimental prospectivo de corte transversal con características operativas (Sampieri, 2010).

Universo

El universo estuvo conformado por 262 pacientes con citología cervical positiva para alteraciones de bajo (LEIBG) y alto grado (LEIAG), atendidas en consulta externa del HBRC durante los meses Noviembre 2015-Febrero 2016.

Muestra

La muestra en estudio fue de 62 pacientes (23.7% del universo); 27 pacientes con diagnóstico histopatológico de Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG), 23 pacientes con Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG) y 12 muestras utilizadas como control negativo interno. Dos muestras fueron excluidas por no cumplir con nuestros criterios de inclusión sin embargo, se les brindó resultado a las pacientes. Las muestras se obtuvieron de acuerdo al programa de atención del hospital, excluyendo a pacientes con otras patologías, por lo que no se captó el mismo número de muestras para cada tipo de lesión en estudio.

Tipo de Muestreo

No probabilístico por Conveniencia (Ruiz Álvaro, 2005; Santos Silva, 1999).

Unidad de Análisis

Pacientes del sexo femenino a las que se les haya realizado el examen del Papanicolaou y cuyo hallazgo sea lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) en el período Noviembre 2015, Febrero 2016.

Criterios de inclusión

1. Pacientes que acuden a consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque con resultado en citología cervical de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG)
2. Pacientes atendidas en el periodo Noviembre 2015, Febrero 2016.
3. Pacientes que no presentaron alteraciones citológicas en su último PAP y fueron atendidas en el periodo de estudio (Utilizadas como control negativo en la estandarización).

Criterios de exclusión

Pacientes con hallazgos en citología cervical de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células escamosas atípicas que sugieren Lesión de alto grado (ASC-H), anormalidades en células glandulares o cualquier atipia diferente a las establecidas en el estudio. Se excluyeron de igual forma pacientes con infección vaginal, pacientes en su periodo menstrual, pacientes en tratamiento con fármacos y que tengas menos de 5 días de abstinencia sexual.

Recolección de la información

Muestra biológica: fue obtenida por el personal médico del hospital, consistió en tomar muestras para pruebas moleculares obtenidas por cepillado endocervical. Los citocepillos se colocaron inmediatamente en 5 ml de medio de transporte (Phosphate buffered saline 0.05%) para mantener la integridad de la muestra, se trasladaron en termos con refrigerantes (15-25°C) al laboratorio de biología molecular de la UNAN-Managua donde se realizó la extracción y purificación del ADN viral.

Instrumento de recolección

Las muestras serán obtenidas con Citocepillo utilizando 5 ml de PBS 0.05% como medio de transporte. Se utilizarán fichas de recolección de datos y hoja de consentimiento informado para cada paciente (ver Anexo 3 y 4). Se utilizó documentación de trabajo tal como cuadernos de registro del laboratorio, bitácoras de trabajo y fotografías de cada corrida de electroforesis para las muestras procesadas cada día.

Procesamiento

La extracción, purificación, detección y genotipificación se realizó en el laboratorio de biología molecular del IPS, UNAN-Managua. Los programas Microsoft Office Word 2007, IBM SPSS statistics 19, Microsoft Office Excel y Microsoft Office Power Point se utilizaron en el procesamiento de los resultados.

VARIABLES DE ESTUDIO

- Toma de muestra para la extracción del ADN.
- Extracción y Amplificación de ADN viral mediante PCR punto final del Virus del Papiloma Humano
- Detección de genotipos 16, 18 y 33 del virus en las pacientes con LEIBG y LEIAG.
- Análisis de resultados mediante parámetros de desempeño.

PROCEDIMIENTO DE REFERENCIA

Se utilizó como referencia el estudio de “Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes” Sánchez, A., Alvarado, E., Reyes, R., & Carrera, R., el cual reveló que todas las mujeres de la investigación, se tomaron muestras cervicales para detectar el ADN del VPH por PCR utilizando cebadores universales de VPH. Además, todas las muestras de ADN de VPH positivos por PCR fueron genotipificadas para el VPH 16, 18 y 33. Se tomó como referencia este estudio, debido a que poseía un sistema de primer más sensible y el costo del mismo era relativamente menor en comparación a otros estudios de América Latina.

VIII. PROTOCOLO ESTANDARIZADO PARA LA GENOTIPIFICACION DEL VPH

Recomendaciones

1. Se recomienda que la paciente haya tenido un periodo de abstinencia sexual de 5 días y que no se haya aplicado ningún tipo de óvulo o cremas vaginales en las 72 horas previas a la toma de muestra. No utilizar lubricantes. No se realizara la toma a mujeres que presenten infección vaginal o sangrado por periodo menstrual.
2. Cuando se ha realizado crioterapia, conización con asa diatérmica o biopsia es recomendable dejar pasar al menos 3 meses antes de realizar una toma de muestra para la biología molecular.

Toma de muestra endocervical

1. Proporcionar el medio de transporte PBS. Tomar la muestra del canal endocervical.
2. Eliminar el exceso de moco cervical con una torunda de algodón seca o hisopo de Dacron. Introducir el “citobrush” en el canal cervical y girar suavemente evitando producir sangrado mientras se realiza la toma de muestra.
3. Una vez tomada la muestra introducir el cepillo en el fondo del tubo con medio de transporte y marcado con el código de la paciente. Cerrar bien el tubo, colocarlo en una gradilla y transportar en refrigeración a temperatura de 15 a 25°C.

Extracción y purificación de ADN viral

Se estandarizó a partir del kit comercial QUIAGEN- QIAamp DNA mini kit.

1. Homogenizar la muestra en Vortex durante 15 segundos, retirar el Citocepillo y centrifugar durante 5 minutos a 10° centígrados a 3,500 RPM.
2. Descartar el sobrenadante dejando 2ml del sedimento y homogenizar en vortex.
3. En un vial de 2 ml agregar 20µl de Proteasa QIAGEN o proteinasa K, 200ul de muestra y 200µl de buffer AL (buffer de lisis). Mezclar en Vortex por 15s.
4. Incubar a 56°C por 10 minutos.
5. Agregar 400ul de Etanol (96-100%) a la muestra y mezclar nuevamente en Vortex. Centrifugar brevemente para remover las gotas del interior de la tapa.
6. Cuidadosamente agregar la mezcla a la QiAmp Mini Spin Colum (en un tubo colector de 2ml). Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Colocar la QiAMP Mini Spin Colum en un tubo colector de 2 ml y descartar el tubo que contiene lo filtrado.
7. Cuidadosamente abrir la QiAMP Mini Spin Colum y agregar 500µl de buffer AW1 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000xg (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar la QiAMP Mini Spin Colum en un tubo colector limpio de 2ml y descartar el tubo colector que contiene lo filtrado.
8. Cuidadosamente abrir la QiAMP Mini Spin Colum y agregar 500µl del buffer AW2 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a alta velocidad (20000xg; 14000 rpm) por 3 minutos.
9. Se recomienda colocar la QiAMP Mini Spin Colum en un nuevo tubo colector de 2ml y descartar el tubo colector usado que contiene lo filtrado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto, ayuda a eliminar los residuos de buffer AW2.
10. Colocar la QiAMP Mini Spin Colum en un tubo limpio de 1.5 ml para microcentrífuga y descartar el tubo colector que contiene lo filtrado. Cuidadosamente abrir la QiAMP Mini Spin Colum y agregar 30µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 5 minuto, luego centrifugar a 6000xg (8000 rpm) por 1 minuto.

11. Medir el ADN extraído en Nanodrop (2ul) y anotar la cantidad y pureza en la bitácora de extracción (ver Anexo 5 y 6).

El ADN extraído y purificado se conservará a -20°C hasta su amplificación

Procedimiento para la mezcla de reacción

1. Preparar en un vial de 1.5 ml la mezcla de reacción en refrigeración con los volúmenes establecidas según lo muestra el siguiente protocolo de trabajo, teniendo en cuenta la concentración final deseada de cada uno de ellos y el número de reacciones (tubos) que se van a llevar a cabo.

Reactivos	Volumen (μl)	Volumen para __ mxs
H2O	29μl	
Buffer PCR 10X Y S	5μl	
Enhancer	10μl	
dNTPs mix	1μl	
Primer Forward	1μl	
Primer Reverse	1μl	
Taq DNA Polimerasa	1μl	
ADN	2μl	
Volumen final	50μl	

2. Agregar 48 ul de la mezcla a cada vial de PCR (200 ul) según número de muestras a analizar.
3. Agregar 2ul de ADN extraído de cada muestra al vial correspondiente. Mezclar cuidadosamente el ADN muestra con la mezcla de reacción, se debe evitar la contaminación por salpicaduras y la degradación al exponer el ADN por largos periodos de tiempo. Agregar 2ul del control positivo, ADN de muestra conocida y en un segundo vial control negativo, agua destilada estéril. Sellar los tubos herméticamente. Se utilizaron como controles positivos muestras conocidas

proporcionadas por el Hospital Metropolitano Vivian Pellas, las cuales fueron transportadas en medio Preservecvt a temperatura ambiente analizadas por medio de GeneXpert.

Se reconstituyeron los primer de trabajo Forward común: 5'AAGGGCGTAACCGAAATCGGT3'; reverse 16, 5'GTTTGCAGCTCTGTGCATA3'; 18, 5'GTGTTTCAGTTCCGTGCACA3', 33, 5'GTCTCCAATGCTTGGCACA3', con agua de uso molecular según las especificaciones del fabricante para obtener una concentración inicial de 100uM, seguidamente se realizó una dilución para obtener una concentración de 10uM para cada tipo de secuencia de ADN. Finalmente se trabajó con un volumen total de 50ul e una tercera alícuota el cual estaba compuesto por 45ul de agua de uso molecular más 5ul de primer a una concentración de 10uM, representando esta última el vial de trabajo para la preparación del master mix. Los volúmenes de cada elemento de la mezcla se utilizaron según la referencia, sin embargo se utilizó Enhancer como aditivo de PCR y potenciador, agente utilizado para incrementar el rendimiento y especificidad de la reacción. Se genotipificó directamente utilizando el sistema de primer MY09/11 que han mostrado buena especificidad en comparación con los otros sistemas de oligonucleótidos (ver Anexo 7)

Amplificación del ADN viral

1. Programar el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos para primer 16 y 18: 45 ciclos de 94°C por 1 minuto para la desnaturalización, 56°C por 1 minuto para el anillamiento y para la extensión 72°C por 1 minuto. Al finalizar, el enfriamiento del bloque de muestra a 4°C. Los productos podrán almacenarse a 4°C hasta su separación en gel de agarosa o a -20°C por periodos más largos. En el caso del primer 33 se debe realizar el cambio de temperatura para anillamiento 57°C por 1 minuto debido a que presenta dímeros de primer que interfieren en la lectura de electroforesis.

2. Se amplificarán las siguientes secuencias específicas contenidas en la región E6 del VPH 16, 18, 33. Forward común: 5'AAGGGCGTAACCGAAATCGGT3'; reverse 16, 5'GTTTGCAGCTCTGTGCATA3'; 18, 5'GTGTTTCAGTTCCGTGCACA3', 33, 5'GTCTCCAATGCTTGGCACA3' (Takara Mirus Bio Corp. Madison WI, USA).
3. Los productos a amplificar mediante electroforesis corresponderán a: 140 pb para el HPV 16, 140pb para HPV 18 y 141pb para HPV 33.

Electroforesis en Gel de Agarosa

Preparación de buffer

- Tris-borato-EDTA (TBE) buffer
1. Disolver los siguientes componentes en 600ml de agua destilada: 108g Tris (FW=121), 55g ácido bórico (FW=61.8), 40ml 0.5M EDTA (pH 8.0).
 2. Ajustar el volumen final con agua destilada hasta obtener 1L de buffer 10X.
 3. Preparar buffer 1X de trabajo, mezclar buffer TBE 10X (100ml) y agua destilada (900ml) en una proporción 1:9.
 4. Conservar a temperatura ambiente (15-25°C)

Preparación del Gel

1. Preparar la cámara de electroforesis. Sellar los bordes de la bandeja, colocar sobre una superficie limpia y nivelada e insertar el peine de gel en la ranura.
2. Pesar en un Erlenmeyer de 250ml, 2.5g de agarosa, disolver en 170ml buffer de corrida (TBE 1x) para obtener un gel de 1.5% respectivamente. Realizar la disolución en un microondas homogeneizando lentamente en varios intervalos de tiempo ($\approx 1'45''$) hasta observar fundida la agarosa.
3. Dejar enfriar la agarosa a (tolerable al tacto), no verter el gel caliente ya que las corrientes de convección que resultan en el gel puede afectar las características de funcionamiento y las bandas pueden no reflejar realmente el tamaño esperado.

4. Agregar 4µl del Bromuro de Etidio y mezclar suavemente. Agregar la solución en la bandeja con el peine, evitando la formación de burbujas.
5. Dejar solidificar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 40 minutos, una vez completamente solidado el gel, retirar cuidadosamente el peine.
6. Añadir buffer TBE 1X a la cámara de electroforesis de modo que el gel quede cubierto por una capa de aproximadamente 2 - 5 mm.
7. Preparar muestras amplificadas, marcadores positivos, negativos y marcador.
8. Colocar 10µl de cada muestra con 2µl de loading buffer en pocillos consecutivos y 4µl de marcador (Ladder) en el primer pozo. Las muestras y controles serán colocadas según protocolo de trabajo (ver Anexo 8).
9. Cerrar la tapa de la cubeta del gel y conectar los electrodos a la fuente de poder, permitir que las muestras migren hacia el ánodo durante 1 hora 20 minutos a 120 voltios.
10. Desconectar la corriente y retirar los cables y la tapa de la cubeta. Introducir el gel en un transiluminador UV, observar la separación de las muestras y anotar resultados. Usar gafas y pantalla facial para evitar quemaduras UV.

Proceso Ético de la investigación

Para la realización del presente estudio se solicitó la autorización del Ministerio de Salud, Departamento de docencia del Hospital Bertha Calderón Roque y del laboratorio de patología así como del consentimiento firmado por las pacientes, a las que se les informó sobre los objetivos del estudio, recolección de la muestra y destino. Se obviaron los nombres de las pacientes para proteger su identidad, las muestras fueron utilizadas para fines investigativos, los resultados fueron confidenciales. Una vez obtenidos los resultados se entregaron al responsable de la clínica 13-3, de consulta externa Dr. Camilo Pravia el cual informará de los resultados obtenidos a las pacientes (ver formato de resultados en Anexo 9).

IX. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Estandarización de la técnica de PCR para la genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Enero 2015-Febrero 2016.

VARIABLES	SUBVARIABLES	INDICADORES	CRITERIOS	VALORES
Extracción y genotipificación	Muestra	Endocervical, obtenida con Citocepillo. PBS 0.05% como medio de transporte T°C 15°-25°	Pureza Cuantificación	1.8-2.0 (A260/280) 4.0-1500ng/μl
	Lisis Purificación Elusión	Protocolo de QIAamp DNA Mini Kit		
	Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final	Desnaturalización Anillamiento Extensión	95° /1min 56°-57° 1 /min 72° /1min 45 ciclos	Si-No
	Electroforesis	Buffer TBE Voltaje/Tiempo Agarosa Bromuro de Etidio	1X 100-120 v/ 1h-1h 20min. 1.5-2.0% 1%	Si-No
	Genotipos Alto Grado	Genotipo 16 Genotipo 18 Genotipo 33	Forward común: 5´AAGGGCGTAAC CGAAATCGGGT3´ Iniciador para el serotipo 16- 5´GTTTGCAGCTCT GTGCATA3´ Iniciador para el serotipo 18- 5´GTGTTCAGTTCC GTGCACA3´	140pb 140pb

		Iniciador para el serotipo 33- 5'GTCTCCAATGCT TGGCACA3'	141Pb	
Características operativas	Límite de detección	4.0-1500ng/μl	Amplificación de ADN	Si – No
	Sensibilidad	(A/ A + C)	95% - 100% pacientes enfermos	Si – No
	Especificidad	(B/ B + D)	95% - 100% pacientes sanos	Si – No
	Eficacia Diagnóstica	(VP + VN / VP+ VN+ FN + FN)	Deficiente, Bueno, Muy bueno	Si – No
	Repetibilidad	Mismas muestras	95%-100% resultados de	Si - No
	Reproducibilidad	Diferentes operarios	la técnica	

X. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

11.1 Ensayos para la estandarización de toma de muestra cervical

Se evaluó la calidad de extracción utilizando hisopo de dacron en 9 muestras, sin previa limpieza del cuello uterino, la presencia de moco cervical influyó en la pureza de las extracciones que estuvieron fuera de los rangos permitidos (1.8-2.0). La poca cantidad de ADN extraído se debió a la deficiencia del hisopo en obtener células del canal cervical. Posteriormente se realizó la toma de muestras con citocepillos, en las pacientes con abundante moco cervical se realizó limpieza previa a la toma. Se extrajo el ADN según el protocolo descrito y se obtuvieron muestras con rangos de pureza óptimo (SD=0.2 ng/ul).

Tabla 1: Pureza de ADN extraído		
Pureza	Frecuencia	Porcentaje
Rangos 1.7	6	11.3%
1.8 a 2.0	42	79.2%
2.1	5	9.4%
Total	53	100.0%

Fuente: Registros en bitácora de cuantificación de ADN

11.1 Ensayos para la estandarización de PCR punto final

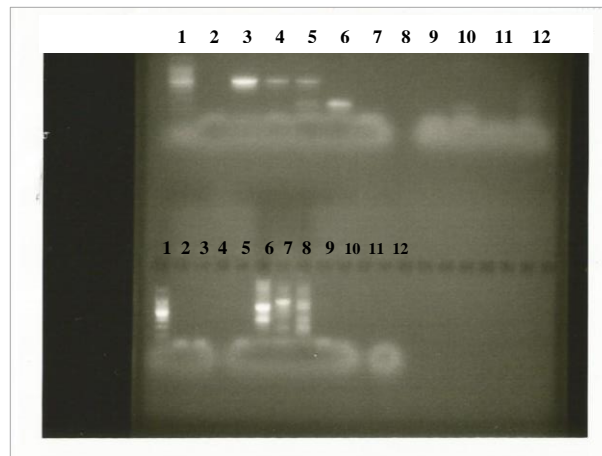
La estandarización toma como referencia el protocolo descrito por Alvarado, C., Carrera, M., Reyes, M., y Sanchez, L. (2006). Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes.

Ensayo 1

La técnica se realizó utilizando muestras conocidas como controles positivos para los tres genotipos en estudio, un control negativo interno de muestra conocida y un segundo control negativo que consistió en agua de uso molecular, en cada una de las corridas. El protocolo de extracción ensayado fue el referido para hisopados por QUIAGEN, para cada muestra conocida (controles positivos) se hicieron tres extracciones a partir del medio de transporte PreservCyt, se realizó la cuantificación del ADN en el nanodrop con una pureza óptima, dentro del rango establecido. Dos de las alícuotas extraídas por muestra, se utilizaron para la primera prueba y la otra alícuota se archivó. Se prepararon viales con los primers suspendidos en concentraciones 50mM y 10mM, uno de archivo y otro de trabajo; así mismo se establecieron los reactivos de trabajo a utilizar en las prácticas y evitar contaminación posterior. El montaje únicamente de los controles positivos y negativos permitió procesar para los tres genotipos en una misma corrida.

La mezcla se realizó con los volúmenes según protocolo, las temperaturas y tiempos de amplificación fueron las mismas a las de referencia. El gel de agarosa se preparó a una concentración de 2%, a 100 voltios durante 1 hora. Se utilizó 2 ul loading Green con 10ul de ADN amplificado, 10ul de marcador y los productos se tiñeron con bromuro de Etidio utilizando 3ul por cada 100 ml del gel de agarosa. Al finalizar la corrida se observaron los

productos amplificados en luz UV, observándose las bandas del marcador superpuestas por lo que no permitían la diferenciación del tamaño de las mismas, los controles para los tipos 16 y 18 presentaban bandas sin embargo su peso no podía definirse muy bien. Para el tipo 33, se observaron múltiples dímeros, en los controles negativos no se observaron banda.

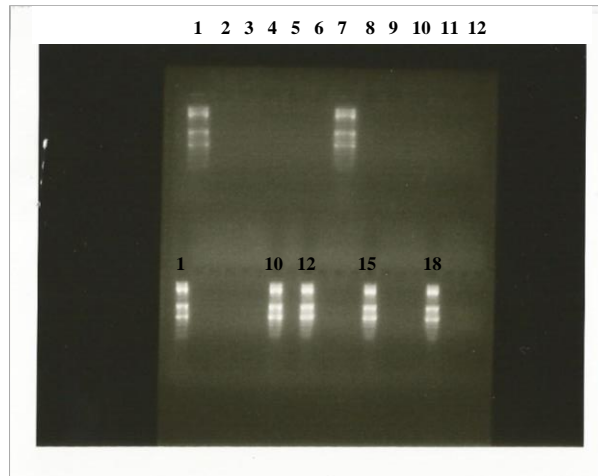


Fotografía 1 tomada a través del transiluminador. **Parte superior, 1: marcador 100pb; 2-7: CP16; 8:CN16; 9-11: CP18; 12: CN1.** **Parte inferior, 1: marcador 100pb; 2-3:CP18; 4:CN18; 5-10: CP33; 12: CN33.**

Ensayo 2

Se prepararon nuevas mezclas de reacción para cada tipo, utilizando las mismas muestras controles de trabajo. Con el propósito de disminuir el volumen de ADN molde y así minimizar los dímeros en la lectura, se agregó 1ul de este; las temperaturas, tiempos y ciclos fueron los mismos a la práctica anterior. Se usó 2ul de loading Green con 10ul de ADN amplificado. El gel se utilizó al 2% a 100 voltios durante 1hora. En la lectura no se observó banda en ninguno de los controles positivos, los marcadores se visualizaron en efecto de barrido. Al revisar los procedimientos en cada una de las etapas se encontró que la enzima TaqPolimerasa empleada, había sido usada antes, durante la preparación de la

mezcla de reacción, esta fue agregada al inicio; el intervalo de tiempo entre la dispensación de la mezcla en los viales y el ADN molde fue prolongado aproximadamente de 15 minutos. Todos estos factores influyeron en la degradación de la enzima por lo que no hubo amplificación.



Fotografía 2 tomada a través de transiluminador. **Parte superior 1: Marcador 100pb; 2-5:CP16; 6:CN16; 7: Marcador 100pb; 8-11:CP18; 12:CN18. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2, 4, 6, 8: CP33; 10, 12, 15, 18: Marcador 100pb; 11:CN33; 14: CNI.**

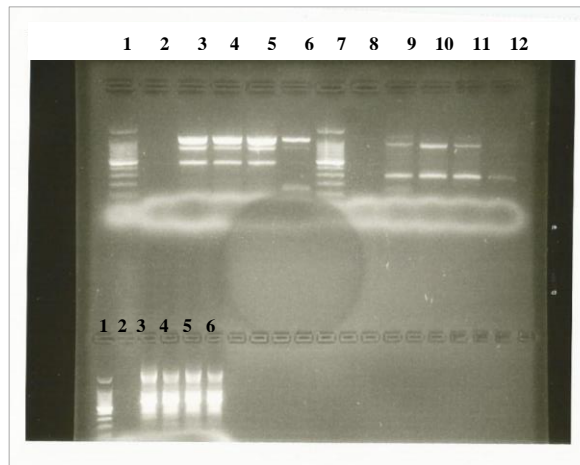
Ensayo 3

Los posibles factores que intervinieron en el ensayo anterior fueron corregidos. Se usó 2ul de ADN molde a como se había ensayado en la primera práctica. Se utilizó una nueva enzima en la que se verificó que no hubiese sido abierta anteriormente y se agregó al final de la preparación de la mezcla, además una vez preparadas las mezclas se dispensó inmediatamente el ADN molde y se colocaron en el termociclador. Se prepararon nuevos primer reverse de trabajo de 10uM para cada tipo. Los marcadores en las corridas anteriores fueron deficientes, lo que indicaba que la densidad del gel intervenía en la separación de las bandas, por lo que se preparó a una concentración de 1.5% a 100 voltios

durante 1 hora, empleando loading blue. Además de correr las mismas muestras controles de las prácticas anteriores, se montaron nuevas extracciones con rangos de pureza óptimos para descartar que el ADN molde se haya desnaturalizado y haya influido en la amplificación anterior.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

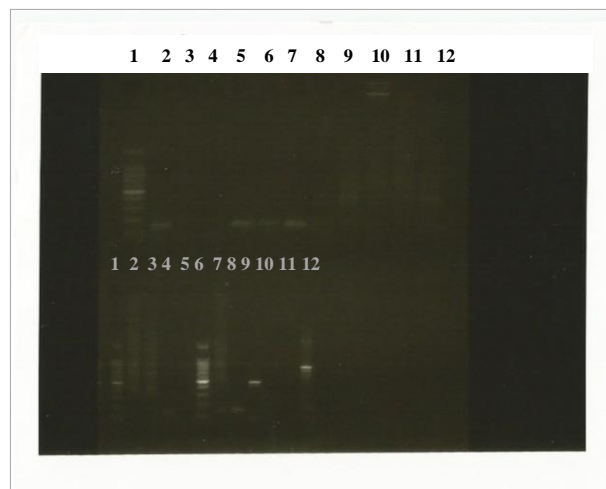
- ✓ Los marcadores mejoraron notablemente, las bandas podían diferenciarse sin embargo en el peine de pozos pequeños aún estaban cercanas unas con otras.
- ✓ Hubo amplificación de los controles, para el genotipo 16 en las tres muestras controles montadas las bandas marcaban arriba del peso esperado (140 pb), en la muestra control extraída nuevamente se observó una banda de 140 pb, esto sugirió la contaminación de las otras muestras controles extraídas anteriormente. En el genotipo 18, todos los controles presentaron bandas de 250 pb aproximadamente. En los controles del genotipo 33 se visualizaron dímeros. Los controles negativos no marcaron banda.



Fotografía 3 tomada a través del transiluminador. **Parte superior 1: Marcador 100pb; 2: CN16; 3-6: CP16; 7: Marcador 100pb; 8: CN16; 9-12: CP18. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2: CN33; 3-6:CP33.**

Ensayo 4

Las extracciones observadas en óptimas condiciones en la corrida anterior se montaron nuevamente, se realizó el procedimiento de mezcla y la electroforesis con mejoras de ensayos previos. Las nuevas variantes practicadas fue el cambio de tiempo de electroforesis a 1 hora 20 minutos. Los Controles para el tipo 16 marcaron 140 pb, para el genotipo 18 disminuyeron los dímeros y las bandas fueron tenues de 140 pb. Los controles del tipo 33, presentaron múltiples dímeros sin banda específica. El control negativo para 16 resultó contaminado.



Fotografía 4 tomada a través del transiluminador. Parte superior 1: Marcador 100pb; 2-5: CP16; 6:CN16; 7-11:CP18; 12: CN18. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2:CP16; 3:CP18; 5: CN33; 6: Marcador 100pb; 7-12: CP33.

Ensayo 5

Se extrajeron nuevos controles positivos para los genotipos 18 y 33, con pureza dentro de 1.8 y 2.0, con cuantificación entre 93 y 125 ug/ul. En prácticas anteriores se observó más presencia de dímeros para el genotipo 33, con el propósito de corregirlos, se agregó 3ul de ADN molde. El procedimiento para los genotipos 16 y 18 se realizó igual al ensayo anterior, se incluyeron en la corrida las nuevas extracciones. Al finalizar, se observaron bandas de 140 pb para los controles 16 y 18, por el contrario en los controles 33 la cantidad de dímeros aumentó.



Fotografía 5 tomada a través del transiluminador. **Parte superior 1: Marcador 100pb; 2-7: CP16; 8: Marcador 100pb; 9-11:CP18; 12:CN18. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2-8: CP33; 9:CN33; 10-20:CP33.**

Ensayo 6

Se corrieron las primeras 3 muestras en estudio, incluida la muestra con ASCUS como control negativo, se utilizaron los controles positivos para cada genotipo montadas en la práctica anterior. El genotipo 33 no se procesó en la misma corrida, dado los resultados con dímeros se evaluó en condiciones de temperatura distintas a los otros genotipos.

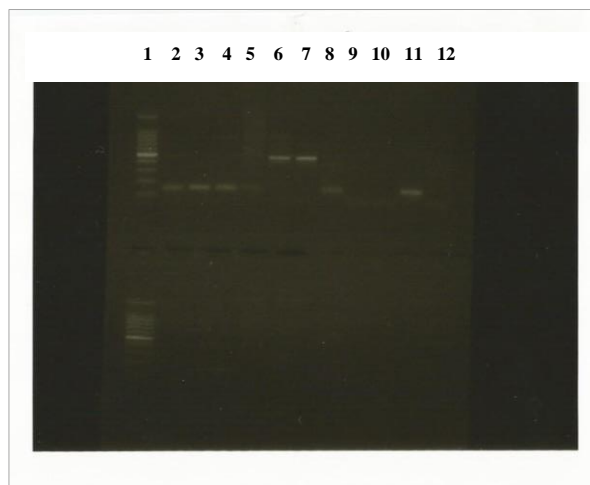
Los resultados fueron satisfactorios así como los controles positivos y negativos. En muestras con pureza fuera del rango se observaron dímeros. Al revisar las muestras de cepillados se encontró abundante moco cervical lo que interfirió en la pureza del ADN extraído. Para corregir esto, se extrajo nuevamente las muestras con pureza fuera del rango para su posterior procesamiento.



Fotografía 6 tomada a través del transiluminador. Parte superior 1: Marcador 100pb; 2: CP16; 3:CN16, 4:P01; 5:P02; 6: Marcador 100pb; 7:P03; 8: CP18; 9: P01; 10:P02, 11:P03, 12:CN18. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2:CN16; 3:P02; 4:CN18; 5:P02.

Ensayo 7

Se procesó únicamente para el genotipo 33, las muestras se montaron por duplicado, además se utilizaron dos controles negativos: agua de uso molecular (CN33) y muestras con ASCUS (CNI). En la mezcla de reacción se agregó 2ul de ADN molde. La temperatura de anillamiento se aumentó a 57°, las temperaturas y tiempos en las otras etapas fueron las mismas a las de referencia. Se observaron bandas con peso de 141 pb en los controles, los dímeros disminuyeron significativamente. Los controles negativos ASCUS (CNI) y agua de uso molecular no marcaron bandas.



Fotografía 7 tomada a través del transiluminador. Parte superior 1: Marcador 100pb; 2-4: CP33; 5:CN33; 6:P01; 7:P02; 8:P03; 9:P01; 10:P02; 11:P03; 12: CNI. Parte inferior 1: Marcador 100pb; 2: CN33; 3: CNI.

Ensayo 8

Las mismas muestras corridas para los genotipos 16 y 18 fueron procesadas para el genotipo 33. Al finalizar, los controles positivos y negativos fueron satisfactorios. Las muestras con dímeros correspondían a ADN fuera del rango de pureza.

Dos de las muestras en estudio con resultados negativos y positivos, incluidos los controles se corrieron nuevamente para evaluar la repetibilidad de la técnica, en la que se obtuvieron los mismos resultados.

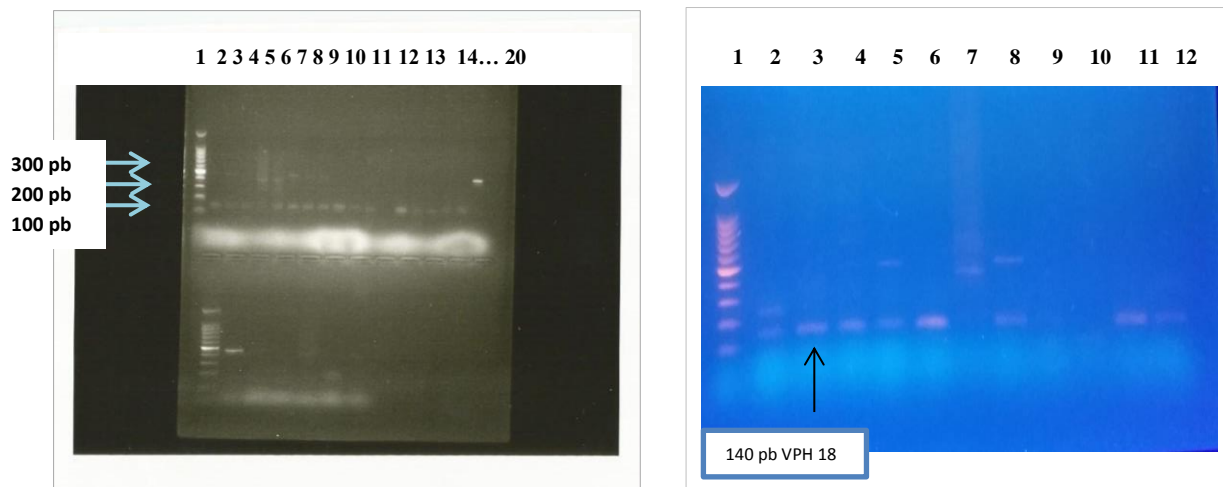
Ensayo 9

Para las muestras con dímeros obtenidas en el ensayo 6, se extrajo ADN nuevamente, se corrieron bajo las mismas condiciones y los resultados fueron iguales, hubo presencia de dímeros, por lo que se procedió a realizar un lavado más durante la extracción con AW1 y AW2. Estas muestras se corrieron para los genotipos 16 y 18; y con diferente temperatura de anillamiento para el genotipo 33. En los resultados, esta vez los dímeros fueron muy pocos sin embargo no todas las muestras mejoraron con los lavados realizados. Por los resultados obtenidos, durante la toma de muestra se recomendó una limpieza previa con torunda de algodón seco para eliminar el exceso de moco cervical que interfiera en la calidad de la muestra. De igual forma, las muestras una vez recepcionadas en el laboratorio se procedió inmediatamente a extraer el ADN para evitar su contaminación y una probable proliferación bacteriana.

Ensayo 10

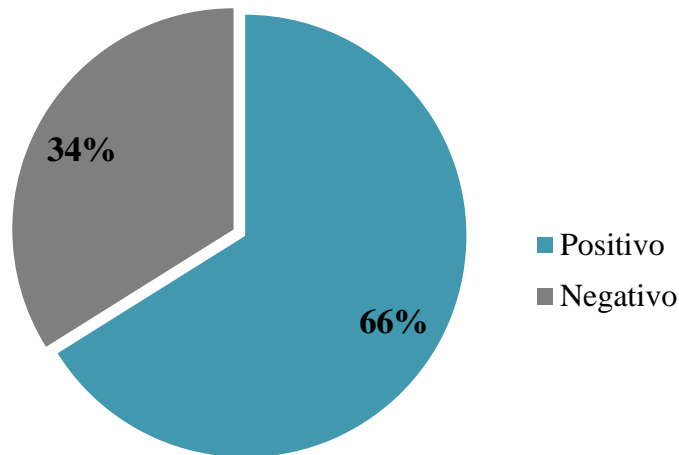
Una vez mejorada la técnica de toma de muestra, durante la extracción de ADN viral no se realizaron lavados adicionales con los buffer AW1 y AW2 con lo que se logró estandarizar dichos procedimientos. Se estableció el procedimiento de preparación de la mezcla de reacción, en la amplificación la temperatura de anillamiento para el genotipo 33 fue la única variante respecto a la referencia. La electroforesis se estandarizó de la siguiente forma: gel agarosa 1.5% a 120 voltios durante 1 hora 20 minutos, utilizando 2ul de loading Blue con 10ul de ADN amplificado, 4ul de marcador y 4ul de Bromuro de Etidio. Las amplificaciones resultantes poseen un peso de 140 pb para VPH 16 y 18; y 141 pb para VPH 33.

Se procesaron el resto de muestras cervicales, es importante destacar que durante la toma de muestra dada las lesiones presentes se producían pequeños sangrados lo que interfirió en la pureza del ADN extraído.



Fotografías de las corridas con la técnica estandarizada. Ambas muestran los resultados de las muestras en estudio. Izquierda 1: Marcador 100pb; 2:CP16; 3-20: Muestras; 7:CN16. Derecha 1: Marcador 100pb; 1, 6: CP18, 12: CN18:7.

Gráfico 1. Resultados obtenidos mediante PCR punto final en pacientes de consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015-Febrero 2016.

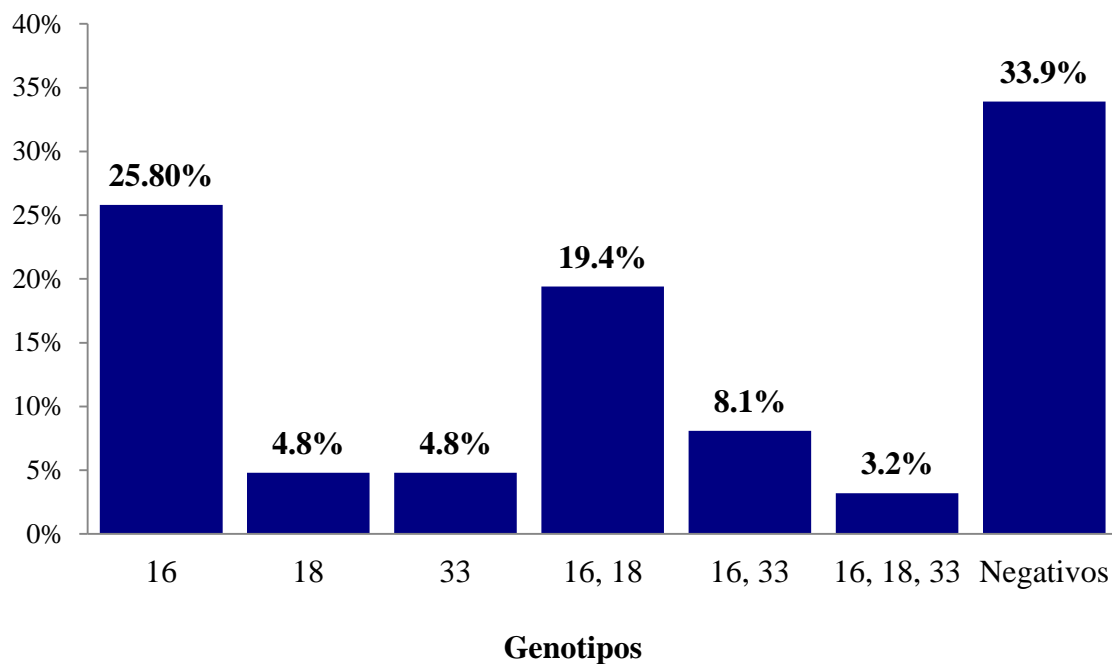


Fuente: Tabla 2

Una vez estandarizado el protocolo de trabajo de la técnica de PCR para VPH, el gráfico 1 refleja los resultados obtenidos de la PCR punto final en donde el 66% de muestras resultaron positivas para la prueba, equivalente a 41 pacientes y un 34% de resultados negativos correspondiente a 21 pacientes. Según el estudio realizado en Venezuela acerca de detección y tipificación del VPH (Quintero, Cruz, Bastida, Marquez & Puig, 2008), se reflejó un porcentaje de positivos del 51.9% de las muestras analizadas mediante PCR-RFLP en mujeres con diagnóstico clínico previo de VPH por citología, colposcopia o biopsia, el cual posee una leve variación de porcentaje de acuerdo a los resultados de nuestro trabajo, sin embargo existe una homología entre ambas investigaciones. De igual forma la investigación efectuada en Argentina sobre detección y tipificación del virus papiloma humano en mujeres con alteraciones ginecológicas compatibles con la infección arrojó un 62% de muestras positivas para una muestra de 60 pacientes (Deluca, Alonso, Lucero, Martin de Civetta & Zibelman, 2001); en este trabajo se analizaron muestras provenientes de pacientes con evidentes alteraciones citológicas que hacían prever la posible infección por VPH, hallándose efectivamente una alta incidencia. Las pacientes en

estudio, tenían citología cervical positiva para alteraciones de bajo (LEIBG) y alto grado (LEIAG) como prueba previa según el algoritmo diagnóstico, característica en común con el trabajo efectuado en Argentina.

Gráfico 2. Frecuencia de genotipos del Virus del Papiloma Humano detectados por PCR en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015-Febrero 2016.



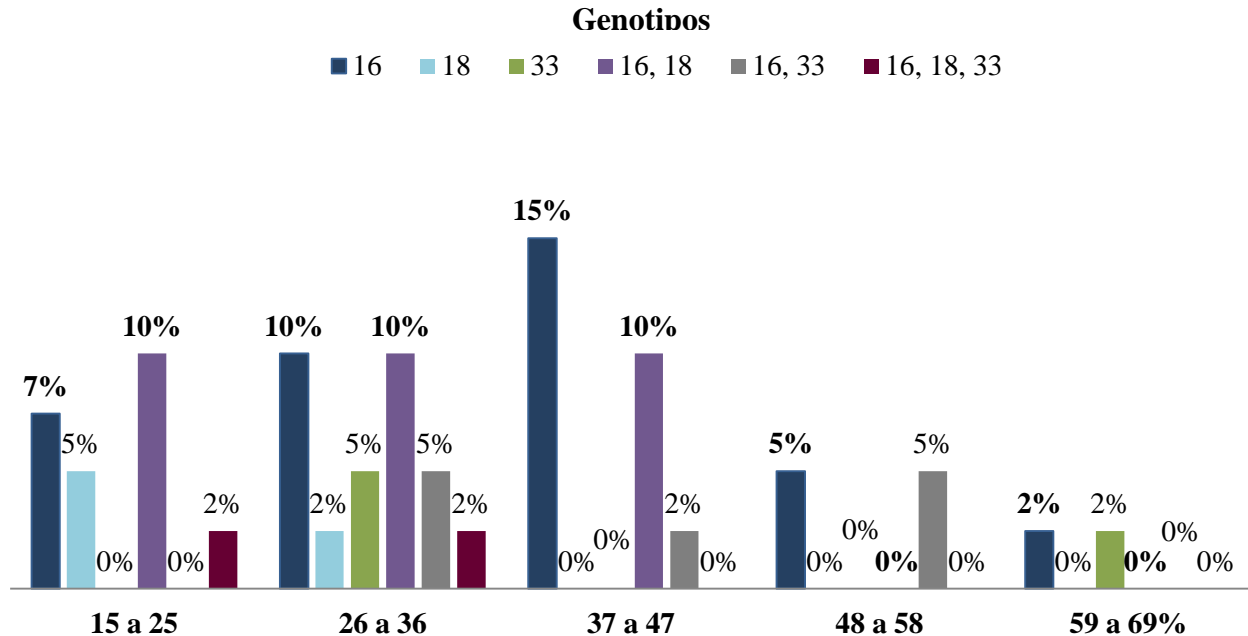
Fuente: Tabla 3

El gráfico 2 muestra la frecuencia de genotipos detectados por PCR punto final alcanzando mayor prevalencia el genotipo 16 con un 25.80% (n=16/41), seguido del genotipo 18 y 33, con un 4.8% respectivamente (n=3/41). Se presentaron de igual forma infecciones mixtas predominando con un 19.4% (n=12/41) infección por VPH 16 y 18; un 8.1% (n=5/41) para la infección ocasionada por VPH 16, y 33; y finalmente un 3.2% (n=2/41) para la infección mixta de VPH 16, 18 y 33. El papilomavirus tipo 16 es el más prevalente de los VPH oncogénicos, responsable de más de la mitad de los tumores, mientras que el papilomavirus tipo 18 está involucrado en el 20% de los mismos (Reimers, Anderson, Rosenberg, Henson & Castle, 2009). Un estudio realizado en Chile en muestras de

adenocarcinoma para detectar y tipificar el VPH en biopsias, utilizando las metodologías combinadas de PCR y enzimas de restricción (PCR-RFLP) y RPC-secuenciación (2009) demostraron, VPH 16 (81%) fue altamente predominante por sobre los otros tipos virales, existiendo una baja frecuencia de VHP 18 (13%), datos similares a los obtenidos en nuestro análisis. Resultados similares se han observado en otras series de casos latinoamericanos donde la frecuencia de VPH 16 fue de 82,6% y 13% para VPH 18 (Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Álvarez M, et al., 2001). La distribución de subtipos del VPH entre las muestras positivas señalan al VPH 16 como el más frecuente (20,7%), según en la investigación aleatoria de población en general de Barcelona en el año 2003. El VPH 33 refleja menores porcentajes de prevalencia, en donde las variaciones geográficas juegan un papel importante en el predominio de uno u otro tipo de VPH, coincidiendo nuestros resultados con los estudios antes mencionados.

Las infecciones mixtas se definen como dos o más tipos de virus en espécimen cervical de la paciente. En este caso se observó al igual que, existen virus coinfectantes en las muestras analizadas en el estudio de detección y tipificación del virus papiloma humano en mujeres con alteraciones ginecológicas compatibles en Argentina (Deluca et.al, 2001). Otra investigación realizada en México (Tamayo, 2002) sobre la asociación y predilección de riesgo de lesión intraepitelial escamosa y cáncer cervicouterino en función de factores: virus del papiloma humano (...), arrojó un 26.1% con dos tipos de virus y 19.8% con tres tipos de virus. Una de las ventajas del uso de la biología molecular es el diagnóstico certero de cambios atípicos ambiguos, que no pueden ser confirmados por citología cervical y así disminuye tratamientos excesivos indicativos de infección por uno o más tipos virales oncogénicos.

Gráfico 3. Genotipos de VPH detectados por PCR según edad de las pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015-Febrero 2016.

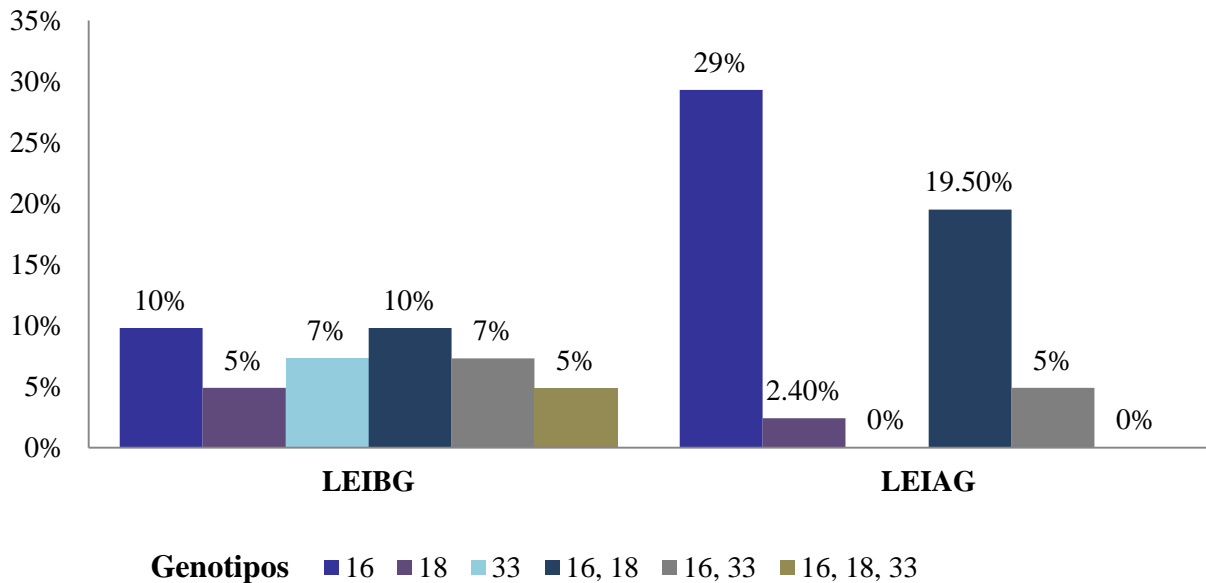


Fuente: Tabla 4

El gráfico 3 revela los genotipos detectados según la edad de las pacientes en donde el VPH 16 fue el más prevalentes en todos los estratos de edades de la población estudiada. En las edades de 37 a 47 años, arrojó un 15% para este genotipo, seguido de un 10% para las edades de 26 a 36 años mencionando los datos más relevantes. Se presentó un 5% entre las edades de 15 a 25 años para el VHP 18 y finalmente la infección mixta predominó entre las edades 15 a 47 años con un 10% para cada estrato. Las técnicas de biología molecular como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de cada tipo, puede considerarse que es una aproximación estimable a la prevalencia del ADN de VPH en la población femenina, siendo esta inferior al 10% en los países desarrollados y ligeramente superior al 15% en los países en vías de desarrollo (De Sanjosé et al., 2006). En las poblaciones donde el número de compañeros sexuales distintos y ocasionales es elevado, la prevalencia puede ser tan elevada como del 30-40% en los grupos de 15 a 36 años de edad. Las observaciones recientes de un potencial de progresión superior para las infecciones persistentes por los VPHs 16/18, podrían llevar a la recomendación de realizar pruebas de

tipo específico para el seguimiento de pacientes con diagnósticos de VPHs positivos (Khan, 2005).

Gráfico 4. Genotipos de VPH, según tipos de lesiones diagnosticadas por Papanicolaou en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Noviembre 2015 - Febrero 2016.



Fuente: Tabla 5

El gráfico 4 muestra los genotipos de VPH estudiados según la lesión diagnosticada por Papanicolaou. El 66% (41 pacientes) de las muestras analizadas resultaron positivas para cualquiera de los genotipos de VPH en estudio, de estas el 44% (n= 18/41) con lesión intraepitelial de bajo grado y el 56% (n=23/41) con lesión intraepitelial de alto grado.

Del 56% de las LEIAG, el 29% está relacionado con el tipo 16 y el 20% causado por la infección mixta 16 y 18.

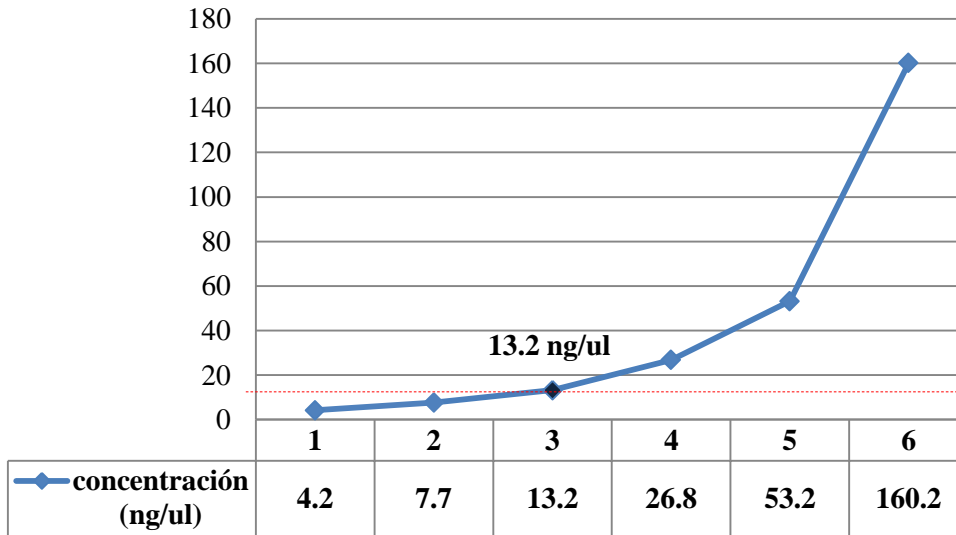
Es importante destacar que todas las pacientes diagnosticadas con LEIBG resultaron positivas para cualquiera de los tipos de VPH, resultando los genotipos 16 (10%) y 16, 18 (10%) los más frecuentes. Tanto para las LEIBG como para las LEIAG los genotipos más frecuentes detectados fueron 16 y la coinfección de VPH 16, 18 respectivamente. Nuestros

hallazgos tienen relación con la investigación de detección y tipificación del virus papiloma humano en mujeres con alteraciones ginecológicas compatibles en Argentina (Deluca et.al, 2001). En este trabajo se analizaron muestras provenientes de pacientes con evidentes alteraciones citológicas que conducían a una posible infección por VPH, hallándose efectivamente una alta incidencia, particularmente entre los LEIAG y entre los casos de cáncer, mientras que en los LEIBG la presencia del ADN viral fue confirmada sólo en el 51% de los casos.

Los programas de prevención del cáncer cervicouterino en países en vías de desarrollo están enfocados en mostrar la importancia de la realización del PAP a las mujeres sexualmente activas para detectar y realizar tratamientos en etapas tempranas de lesiones atípicas, sin embargo dada la baja sensibilidad de la citología para detectar las lesiones de bajo grado y la poca recurrencia de las pacientes al chequeo anual, permite el desarrollo de la infección, es por esto la importancia de la implementación de pruebas de ADN viral que le permita al personal médico mediante la evaluación de los resultados de citología como de biología molecular establecer un tratamiento más oportuno.

Para evaluar los parámetros de desempeño se relacionaron los resultados obtenidos de acuerdo a las fórmulas estadísticas de cada uno que se presenta a continuación:

Gráfico 6. Límite de detección de la PCR estandarizada



Fuente: Tabla 6

A partir de nuestros controles positivos para cada genotipo se realizaron 6 diluciones seriadas (1:2) para determinar el límite de detección y según los datos obtenidos en el Nanodrop y las bandas en electroforesis, el límite de detección de la técnica estandarizada es de 13.2 ng/ul.

Sensibilidad y especificidad

Prueba	Con lesiones	Sin lesiones	Total
VPH positivas	41	0	41
VPH negativas	0	12	12
	41	12	53

$$E = 100\% \quad S = 100\%$$

De nuestra muestra de 62 pacientes, 41 pacientes tenían anomalías (LEIAG o LEIBG) en citología y 12 pacientes con resultados normales en PAP, obteniendo de igual forma resultados negativos de la técnica de PCR. Del total de muestras, 9 resultaron negativas para los genotipos en estudio por los que se excluyeron para el cálculo de los parámetros de desempeño debido a que estas muestras probablemente sean positivas para otro genotipo de VPH que esta técnica no se detectó en este estudio de genotipificación.

La PCR punto final estandarizada para la genotipificación del Virus del Papiloma Humano obtuvo 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. Gutiérrez (2011) afirma: que la sensibilidad y especificidad de la citología muestra capacidad limitada (50-60%) en el diagnóstico del VPH; la técnica estandarizada presenta una sensibilidad mayor a la del PAP sin embargo existe un porcentaje en el que la prueba no identifica al virus, esto se explica debido a que la técnica únicamente detecta tres genotipos de VPH de alto riesgo, por lo que un resultado negativo no excluye a los más de 100 genotipos existentes de alto o bajo riesgo.

La Especificidad de la prueba resultó excelente con un 100%, lo que demuestra su capacidad de detectar eficientemente a los genotipos de alto riesgo 16, 18 ó 33 proporcionando resultados que permitan un tratamiento temprano y evaluación o seguimiento oportuno a las pacientes.

Eficacia diagnóstica

En la técnica estandarizada se obtuvo una eficacia diagnóstica de 100%, la cual representa el porcentaje o la probabilidad de que un paciente sea diagnosticado correctamente por la técnica, o la probabilidad de que esa prueba diagnóstica proporcione resultados acertados. Cabe mencionar la eficacia diagnóstica para esta técnica sólo corresponde a los genotipos en estudio.

$$Eficacia = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

$$\times = \frac{41 + 12}{53} = \frac{53}{53} = 1 \times 100 = 100\%$$

Repetibilidad

Se evaluó la Repetibilidad de la técnica procesando 10 veces, en diferentes corridas; 9 muestras, 1 control positivo para cada genotipo, 1 control negativo y 1 control negativo interno. Los procedimientos de extracción de ADN, preparación de la mezcla de reacción y electroforesis fueron en realizados utilizando la misma técnica bajo las mismas condiciones en intervalos de tiempo diferentes, los cuales se midieron cualitativamente por las bandas en el gel de agarosa obteniendo los mismos resultados; la técnica de extracción se midió realizando tres extracciones de las muestras y controles por dos analistas diferentes obteniendo valores con SD 0.25 por lo que la técnica para la genotipificación de VPH estandarizada es 100% repetible (Ver anexo 10).

Reproducibilidad

Se evaluó la reproducibilidad procesando los controles positivos para cada genotipo, además de un control negativo y un control negativo interno. Las evaluaciones se realizaron en diferentes corridas y fechas, por dos analistas distintos utilizando las mismas técnicas en cada etapa del proceso obteniendo los mismos resultados por lo que la técnica estandarizada es 100% reproducible (Ver anexo 11).

XI. CONCLUSIONES

- El procedimiento de toma de muestra cervical más idónea fue a partir de cepillados cervicales utilizando PBS 0.05% como medio de transporte.
- La extracción de ADN fue realizada con el Kit QIAamp DNA, resultando óptimas con una DS de 0.25. La amplificación se realizó en 45 ciclos a 95°/1min para la desnaturalización, 56°/1min en el anillamiento y 75°/1min en la extensión, para los genotipos 16 y 18. Para el genotipo 33, el anillamiento se realizó a 57°/1min. Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%.
- Los resultados más relevantes fueron: el 66% de las muestras resultaron positivas, el genotipo más frecuente fue el 16 con un 25.8%, el 19.4% de las pacientes presentaron infecciones mixtas con los genotipos 16/18. Las pacientes más afectadas oscilan entre las edades de 26 a 36 años. El 29% de LEIAG están relacionadas al genotipo 16 y un 20% a la infección mixta por los genotipos 16/18. En las LEIBG los genotipos 16 e infección mixta 16/18 fueron los más frecuentes con un 10% para cada caso.
- La técnica PCR punto final estandarizada, obtuvo un límite de detección de 13.2ng/μl con una sensibilidad y especificidad de 100%, reproducibilidad y repetibilidad de 100% y una eficacia diagnóstica del 100%.

XII. RECOMENDACIONES

- **A las pacientes en riesgo**

Realizarse las pruebas de PAP como medida preventiva para la detección temprana del Cáncer Cervicouterino asociado al Virus del Papiloma Humano.

- **Al Hospital Bertha Calderón Roque**

Transmitir información por medio de jornadas dirigida a las mujeres sexualmente activas para disminuir el número de casos de infección por VPH y motivar a la realización de exámenes de rutina para la prevención temprana de cáncer cervicouterino. Es de suma importancia ampliar la cobertura de toma de PAPs como método de prevención y diagnóstico temprano del VPH así como la utilización de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) en la genotipificación.

Realizar programas de concientización o consejería a pacientes diagnosticadas con LEIAG Y LEIBG en el cumplimiento de las orientaciones del personal y la importancia del uso del condón como disciplina apropiada para la prevención de las ITS

○ **Al Ministerio de Salud (MINSA)**

Promover la incorporación y uso de pruebas de detección viral sensibles y específicas dirigidas para la investigación del Virus del Papiloma Humano.

Orientar al seguimiento de las pacientes afectadas con el VPH para obtener datos epidemiológicos con fines investigativos para genotipificar el papilomavirus predominantes en Nicaragua así como la vigilancia médica de estas pacientes mediante el estudio de secuenciación de híbridos como base de proyectos investigativos.

○ **A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN - Managua)**

Promover la investigación sobre otros Genotipos de Alto y Bajo de riesgo de VPH, motivando así las investigaciones científicas en esta línea de estudio.

Capacitar a los alumnos de la carrera de Microbiología acerca de los avances en el campo de la biología molecular con las prácticas de profesionalización en este campo.

Brindar al público pruebas del VPH accesibles a pacientes afectados consiguiendo así el diagnóstico idóneo y oportuno a pacientes en riesgo.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, C., Carrera, M., Reyes, M., y Sánchez, L. (2006). Human papillomavirus infections in women seeking cervical Papanicolaou cytology of Durango, Mexico: prevalence and genotypes. *BMC Infections Diseases*, 6(27), 1-6. doi:10.1186/1471-2332-6-27
- Bermúdez, J., Cabezas, C., García, K. & Gaitán, S. (2013). Pruebas de detección del cáncer cervicouterino asociado al virus del papiloma humano (VPH) en mujeres atendidas en consulta externa del hospital Bertha Calderón Roque en el período, Enero-Julio 2013. Polisal, UNAN Managua. Recuperado de revistauniversidadyciencia.unan.edu.ni/index.php/ruc/article/.../88/79
- Lazo, E. (2015). *Tipificación del Virus del Papiloma Humano en pacientes con citología cervical anormal, atendidas en el Hospital Alemán Nicaragüense, en los meses de Julio a Diciembre del 2014* (Tesis de maestría). Hospital Alemán Nicaragüense, Managua, Nicaragua.
- Manos, M. M., Waldman, J., Zhang, T. Y., Greer, C. E., Eichinger, G., Schiffman, M. H., & Wheeler, C. M. (1994). Epidemiology And Partial Nucleotide Sequence Of Four Novel Genital Human. *Journal of Infectious Diseases*, 170(5), 1096-1099. Recuperado de <http://jid.oxfordjournals.org/content/170/5/1096.short>
- Fujinaga, Y., Shimada, M., Okazawa, K., Fukushima, M., Kato, I., & Fujinaga, K. (1991). Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*, 72(5), 1039-1044. Recuperado de

<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-72-5-1039>

Pirog, E. C., Kleter, B., Olgac, S., Bobkiewicz, P., Lindeman, J., Quint, W. G., ... & Isacson, C. (2000). Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *The American journal of pathology*, 157(4), 1055-1062. Recuperado de [http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(10\)64619-6/abstract](http://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(10)64619-6/abstract)

Consuegra, P., Egea, E., Campo, D., & Garavito, G. (2015). El virus del papiloma humano (hpv), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical. *Revista de la división de ciencias de salud de la universidad del norte Barranquilla Colombia*, 19. Recuperado de <http://www.uees.edu.sv/editorial/publicaciones/Normas%20APA%20Sexta%20Edici%C3%B3n.pdf>

Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., Munoz, N., & Villa, L. L. (2006). HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*, 24, S26-S34. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X06005937>

Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., & Clifford, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International journal of cancer*, 121(3), 621-632. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.22527/full>

Picconi, María Alejandra. (2013). Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. *Medicina (Buenos Aires)*, 73(6), 585-596. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802013000800017&lng=es&tlng=es.

Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*, 4(8), 1629. Recuperado de http://download.springer.com/static/pdf/760/art%253A10.1186%252F1750-9378-4-8.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Finjectagentscancer.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1750-9378-4-8&token2=exp=1457456934~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F760%2Fart%25253A10.1186%25252F1750-9378-4-8.pdf*~hmac=5c9758936995880b932ac4ac1222a6651c9c0d1a1f6c54148de58a4c8fbc20eb

Villalobos, M. (2006). *Implementación de un protocolo de extracción de ADN a partir de biopsias humanas y determinación de su calidad para PCR* (Tesis de pregrado). Instituto tecnológico, escuela de biología, Cartago, Costa Rica. Recuperado de <http://bibliodigital.itcr.ac.cr/bitstream/handle/2238/477/Extraccion%20y%20PCR%20para%20parafinadas%20de%20la%20CCSS-Maria%20Jose%20Villalobos%20Quesada.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

García, Dabeiba A, Schmitt, Markus, Cid-Arregui, Ángel, Castillo, Marcos, Briceño, Ignacio, & Aristizábal, Fabio A. (2010). Genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes

hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(4), 310-318. Retrieved March 03, 2016, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342010000400004&lng=en&tlng=es.

Quintero Vega, Militza, Cruz Gómez, Jhon Fredy, Bastidas, Marco, Márquez, Lusmary, & Puig Pons, Juan. (2008). Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 68(1), 25-31. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322008000100006&lng=es&tlng=es.

Vela, C. (1997). Instituto de investigación patológica. CITOPAT: Lima-Perú. Recuperado de <http://citopatperu.com/estudiocomp1.html>.

Camaró, M., Catalá, V., Gimeno, C., Martínez, R., & Olmos, P. (2013). *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Sociedad española de enfermedades infecciones y microbiología clínica. 12-18.

Lizano, M., Carrillo, A., & Contreras, A. (2009). Infección por Virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Instituto Nacional de cancerología*, 4, 205-216. Recuperado de <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1272302572.pdf>

Bastidas, M., Cruz, J., Márquez, L., Puig, J., & Quintero, M. (2008). Detección y tipificación de Virus del Papiloma Humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Revista de obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 68(1), 25-31. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-773220080001000

Anexos

ANEXO 1: TABLA

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante PCR punto final en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Enero 2015-Febrero 2016.

	Resultado					
	Positivos		Negativos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Pacientes	41	66.1%	21	33.9%	62	100.0%

Tabla 3. Frecuencia de genotipos detectados por PCR en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Enero 2015-Febrero 2016.

		Frecuencia	Porcentaje
Genotipos	16	16	25.8%
	18	3	4.8%
	33	3	4.8%
	16, 18	12	19.4%
	16, 33	5	8.1%
	16, 18, 33	2	3.2%
	Negativos	21	33.9%
	Total	62	100.0%

Tabla 4. Genotipos detectados según edad de las pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Enero 2015-Febreo 2016.

			Genotipo					Total	
			16	18	33	16, 18	16, 33		16, 18, 33
Edad	15 a 25	Frecuencia	3	2	0	4	0	1	10
		Porcentaje	7.3%	4.9%	.0%	9.8%	.0%	2.4%	24.4%
	26 a 36	Frecuencia	4	1	2	4	2	1	14
		Porcentaje	9.8%	2.4%	4.9%	9.8%	4.9%	2.4%	34.1%
	37 a 47	Frecuencia	6	0	0	4	1	0	11
		Porcentaje	14.6%	.0%	.0%	9.8%	2.4%	0%	26.8%
	48 a 58	Frecuencia	2	0	0	0	2	0	4
		Porcentaje	4.9%	.0%	.0%	.0%	4.9%	0%	9.8%
	59 a 69	Frecuencia	1	0	1	0	0	2	2
		Porcentaje	2.4%	.0%	2.4%	.0%	.0%	4.9%	4.9%
Total			16	3	3	12	5	2	41
			39.0%	7.3%	7.3%	29.3%	12.2%	4.9%	100.0%

Tabla 5. Genotipos según tipos de lesiones diagnosticadas en PAP en pacientes atendidas en consulta externa del Hospital Bertha Calderón Roque, Enero 2015-Febreo 2016

Genotipo		Tipo de lesión		Total
		LEIBG	LEIAG	
16	Frecuencia	4	12	16
	% dentro de Genotipo	25.0%	75.0%	100.0%
18	Frecuencia	2	1	3
	% dentro de Genotipo	66.7%	33.3%	100.0%
33	Frecuencia	3	0	3
	% dentro de Genotipo	100.0%	.0%	100.0%
16, 18	Frecuencia	4	8	12
	% dentro de Genotipo	33.3%	66.7%	100.0%
16, 33	Frecuencia	3	2	5
	% dentro de Genotipo	60.0%	40.0%	100.0%
16, 18, 33	Frecuencia	2	0	2
	% dentro de Genotipo	100.0%	.0%	100.0%
Total		18	23	41
		43.9%	56.1%	100.0%

Tabla 6: Límite de detección

N° dilución	Concentración ADN (ng/μl)	Banda de peso molecular
1	106.20	Muy Buena
2	53.20	Muy Buena
3	26.8	Buena
4	13.20	Regular
5	7.70	No se observó
6	4.20	No se observó

Tabla 7. Parámetros estadísticos en la evaluación de la pureza de ADN extraído.

Rango pureza	1.8-2.0
Total muestras	62
Media	1.93
Desviación típica	0.25
Varianza	0.06

ANEXO 2: REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos	Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> • Kit QiAmp mini DNA • Secuencias de AND (Primer F, Primer 16, 18 y 33) • ADN ladders (100bp) • Loading buffer electrophoresis blue • Agarosa 100gr • Primer master mix • Bromuro de tideo • Agua de uso molecular • PBS 0.05% • Etanol 70% • Alcohol 75% • ARNasa Away 	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos para centrifuga 1.5ml • Tubos para PCR 0.5ml • Puntas de pipetas automáticas • Guantes de uso molecular • Tubos microcentrifuga 250ul • Papel absorbente • Parafilm • Beaker • Erlenmeyer • Probeta 	<ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga • Vortex • Microcentrifuga • Termociclador Eppendorf • Cámara de electroforesis • Fuente de poder para electroforesis • Transiluminador UV • Refrigerador • Congelador • Balanza • Espátula • Citocepillos • Microondas • Termobloque • Espectrofotómetro NanoDrop • Pipeta Automática 0.5-10ul • Pipeta automática 20-200ul • Pipeta Automática 10-100ul • Pipeta Automática 100-1000ul

ANEXO 3. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La presente ficha tiene como objetivo obtener información acerca de las pacientes participantes en el estudio sobre la Estandarización de la técnica de PCR para la genotipificación del Virus del Papiloma Humano en el Hospital Bertha Calderón Roque.

Fecha: Nombre y Apellidos:	Código muestra:
	Expediente:
	Edad:
	Procedencia:
Diagnóstico citológico:	
<i>Las pacientes han sido informadas sobre los objetivos del estudio y por medio de la presente ficha dan su consentimiento para obtención y utilización de muestras (cepillados cervicales) con fines investigativos, sus nombres serán omitidos si la paciente lo estima conveniente. Una vez obtenidos los resultados serán entregados al responsable de la clínica 13-3 Dr. Pravia.</i>	
Firma del médico: _____	Firma del paciente: _____
Observaciones:	

ANEXO 4: CONSENTIMIENTO INFORMADO



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA**

INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD

“LUIS FELIPE MONCADA”

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



**CONSENTIMIENTO INFORMADO SOBRE PRUEBA DE GENOTIPIFICACIÓN DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN PACIENTES ATENDIDAS EN
CONSULTA EXTERNA DEL HOSPITAL BERTHA CALDERÓN ROQUE, ENERO
2015-FEBRERO 2016.**

Yo, _____; mayor de edad, paciente activo del Hospital Bertha Calderón Roque, en pleno uso de mis facultades mentales, autorizó el estudio que se basa en la genotipificación del virus del papiloma humano (VPH) con el fin de estandarizar la técnica del laboratorio para su posterior uso en otras investigaciones afines en pro del desarrollo científico y de la obtención de datos epidemiológicos de enfermedades causante del cáncer cervivouterino.

Se realiza la toma de muestra del cérvix con el uso de citocepillo o citobrush, con previa limpieza, esta muestra se trasladara en medio de transporte PBS al 0.05% al laboratorio de biología molecular en cadena de frio, para su posterior análisis.

Los resultados de dicha prueba serán entregados en la clínica donde se atienden a las pacientes en donde posteriormente el médico le mostrara y explicara su resultado. Se adjuntara el mismo al expediente de la paciente como parte de su historial clínico.

Firma del paciente

Firma del analista clínico

ANEXO 5. BITÁCORA DE EXTRACCIÓN DE ADN



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”**



LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Bitácora Extracción de ADN(Nanodrop)

Fecha	Cód. Lab.	Tipo de muestra	A260/280	Concentración (ng/ul)

Observaciones:

ANEXO 6. NUCLEID ACID CONCENTRATION RANGE

Sample type	Lower Detection Limit	Upper Detection Limit	Typical reproducibility (10 replicates, SD=ng/ul; CV=%)
dsDNA	4.0 ng/μl	1500 ng/μl	4.0-100 ng/μl: +/-2 ng/μl >100 ng/μl: +/- 2%
ssDNA	2.6 ng/μl	990 ng/μl	2.6 – 66 ng/μl: +/-1.3 ng/μl >66 ng/μl: +/- 2%
RNA	3.2 ng/μl	1200 ng/μl	3.2 – 80 ng/μl: +/- 2%

Note Absorbance reported is normalized to a 1.0 cm (10.0 mm) pathlength for all measurements

Tomado de: Thermo scientific NanoDrop Lite, user guide, January 2012.

ANEXO 7. PROTOCOLO DE ELABORACION DE MEZCLA DE REACCION



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA

INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD

“LUIS FELIPE MONCADA”

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR



Fecha de PCR: _____

Nombre del estudio: _____

REACTIVOS	VOLUMEN	VOLUMEN X NÚMERO DE MUESTRA
H2O	29µl	
Buffer PCR 10X Y S	5µl	
Enhancer	10µl	
dNTPs mix	1µl	
Primer Forward	1µl	
Primer Reverse	1µl	
Taq DNA Polimerasa	1µl	
Mix tubo	48 µl	
ADN molde	2 µl	

Observaciones:

Analista:

ANEXO 8. PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
NICARAGUA, MANAGUA
INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR**



DATOS GENERALES DE LA CORRIDA DE PCR, PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS

Fecha de corrida: _____

Nombre del estudio: _____

Pozo	Datos (muestras)	Resultado	Pozo	Datos (muestras)	Resultado
1			13		
2			14		
3			15		
4			16		
5			17		
6			18		
7			19		
8			20		
9			21		
10			22		
11			23		
12			24		

Observaciones:

Analista:

ANEXO 9. FORMATO DE RESULTADOS

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
NICARAGUA, UNAN-MANAGUA**



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
“LUIS FELIPE MONCADA”**



**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
REPORTE DE ANÁLISIS MOLECULAR**

FECHA:

EXPEDIENTE:

NOMBRE:

EDAD:

HOSPITAL:

PRUEBA REALIZADA: Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR punto final para los genotipos del VPH 16, 18, 33.

RESULTADO

Genotipo 16	
Genotipo 18	
Genotipo 33	

OBSERVACIONES: Se genotipificó para los tipos de alto riesgo 16, 18 y 33 respectivamente, algún diagnóstico clínico no congruente con resultado del análisis molecular, es indicativo de infección por otro genotipo de bajo o alto riesgo.

Laboratorio de Biología Molecular
POLISAL/ UNAN-Managua

ANEXO 10. REGISTROS DE ENSAYOS PARA DETERMINACIÓN DE REPETIBILIDAD

Muestra extraída	Cuantificación	Pureza	Electroforesis
Control genotipo 16	25.3	2.0	Positivo
	24.1	2.0	Positivo
	24.7	1.99	Positivo
Control genotipo 18	30.2	1.8	Positivo
	29.9	1.8	Positivo
	31.0	1.8	Positivo
Control genotipo 33	35.5	2.0	Positivo
	35.2	1.9	Positivo
	36.0	1.9	Positivo

N° corrida	F	M 01	M 02	M 03	M 04	M 05	M 06	M 07	M 08	M 09	CP 16	CP 18	CP 33	C N	C NI
1	08/12/15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	09/12/15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	10/12/15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	11/12/15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	14/12/15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	12/01/16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	13/01/16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	14/01/16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	15/01/16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	18/01/16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Total %		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

F: Fecha de corrida
A1: Analista 1
A2: Analista 2

M: Muestras
CP: Control positivo
CN: Control negativo
CNI: Control negativo interno

ANEXO 11: REGISTROS DE ENSAYOS PARA DETERMINACIÓN DE RERODUCIBILIDAD

N° corrida	Fecha	Analista	CP 16	CP 18	CP 33	CN	CNI
1	08/12/15	Analista 1	✓	✓	✓	✓	✓
2	09/12/15	Analista 1	✓	✓	✓	✓	✓
3	10/12/15	Analista 2	✓	✓	✓	✓	✓
4	11/12/15	Analista 2	✓	✓	✓	✓	✓
5	14/12/15	Analista 1	✓	✓	✓	✓	✓
6	12/01/16	Analista 1	✓	✓	✓	✓	✓
7	13/01/16	Analista 2	✓	✓	✓	✓	✓
8	14/01/16	Analista 2	✓	✓	✓	✓	✓
9	15/01/16	Analista 1	✓	✓	✓	✓	✓
10	18/01/16	Analista 2	✓	✓	✓	✓	✓
Resultado			Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

ANEXO 12. FOTOS



Figura 1: QUIAGEN- QIAamp DNA mini kit.

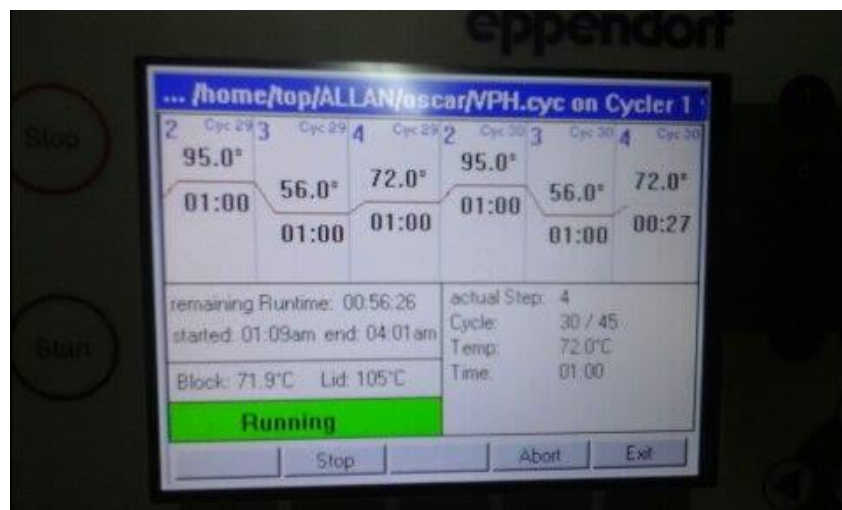


Figura 2: Tiempos en Termociclador



Figura 3. Cámara de electroforesis

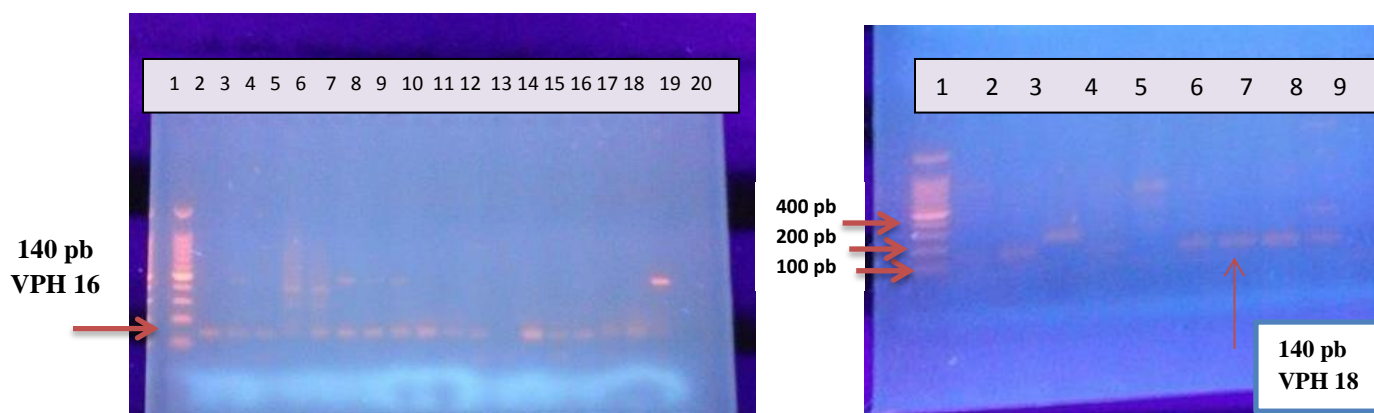


Figura 4. Fotografías de las corridas con la técnica estandarizada. Ambas muestran los resultados de las muestras en estudio. Izquierda 1: Marcador 140pb; 2: CP16, 3,4, 6-12; 13: CNI; 14-18: muestras positivas VPH 16, pozo 19-20: negativas. Derecha 1: Marcador 140 pb; 2:CN; 3: CP18; 6-9: Muestras positivas VPH 18.

ANEXO 13: GLOSARIO

- **Cáncer invasor:** Cualquiera de las etapas de carcinoma invasivo, desde aquellos diagnosticados sólo por microscopio, hasta las lesiones de gran magnitud con invasión al estroma, extensión a todo el órgano, órganos adyacentes y propagación a órganos distantes.
- **Discariosis:** alteraciones celulares de los epitelios y del mesenquima de su forma, tamaño, alineación , pigmentación etc dichos cambios pueden ser transitorios, reversibles, o no, en caso de progresar a regiones vecinas la discariosis recibe un cambio de denominación dentro de las lesiones precancerígenas
- **Displasia:** Pérdida de la capacidad de maduración del epitelio, con alteraciones en la morfología de sus componentes celulares. Alteración de un tejido debido a una excesiva proliferación celular, provocada por cambios hormonales o inflamaciones crónicas.
- **Escisión:** Es la extirpación de tejido utilizando un escalpelo (cuchillo afilado) u otro instrumento cortante.
- **Espécimen:** Muestra, modelo o ejemplar que tiene las cualidades o características de su especie muy bien definidas.
- **Inosina:** nucleósido que se forma cuando hipoxantina está unido a un anillo de ribosa a través de un-N9-glicosídico. La inosina se encuentra comúnmente en los ARNt y es esencial para la traducción apropiada del código genético en pares de bases de oscilación.

- **Oncoproteína:** Proteína expresada por un gen mutado o por un virus, que interviene en el desarrollo del cáncer.
- **Sistema de Clasificación Bethesda:** Nomenclatura sobre los lineamientos para el reporte de resultados de la citología cervical.
- **Zona de transformación:** Es el área comprendida entre el epitelio escamoso original y el epitelio columnar del cérvix uterino, dentro de la cual pueden identificarse diversos grados de maduración del epitelio metaplásico.