



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO

**Incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del
servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad
de Loja.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE LICENCIADO
EN LABORATORIO CLÍNICO**

AUTOR:

Joffre Andrés Toledo Jaramillo

DIRECTORA:

Lic. Alicia Silvana Villavicencio Obando, Mg. Sc.

**Loja – Ecuador
2019**

CERTIFICACIÓN

Lic. Alicia Silvana Villavicencio Obando, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **“INCIDENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN USUARIAS DEL SERVICIO DE GINECOLOGÍA DEL CENTRO DE SALUD N°3 DE LA CIUDAD DE LOJA”** de autoría de la Sr. **JOFFRE ANDRES TOLEDO JARAMILLO**, previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico.

Loja, 4 de enero de 2019

Atentamente,



Lic. Alicia Silvana Villavicencio Obando, Mg. Sc.

DIRECTORA DE TESIS

AUTORÍA

Yo, **JOFFRE ANDRES TOLEDO JARAMILLO** con CI. 1104837107 declaro ser autor del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autor: Joffre Andrés Toledo Jaramillo

Firma:  _____

Cédula: 1104837107

Fecha: 4 de enero de 2019

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Joffre Andrés Toledo Jaramillo, declaro ser autor del trabajo de investigación **“INCIDENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN USUARIAS DEL SERVICIO DE GINECOLOGÍA DEL CENTRO DE SALUD N°3 DE LA CIUDAD DE LOJA”**, como requisito para optar el grado de Licenciado en Laboratorio Clínico: autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de su visibilidad del contenido de la siguiente manera en el repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 4 días del mes de enero del dos mil diecinueve, firma el autor.

Firma: _____

Autor: Joffre Andrés Toledo Jaramillo

Cédula: 1104837107

Correo electrónico: joffretoledo@gmail.com

Teléfono: dom. 072711096 Cel. 0989765780

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora de Tesis: Lic. Alicia Silvana Villavicencio Obando, Mg. Sc.

Tribunal de grado:

Presidenta de tribunal: Dra. Sandra Elizabeth Freire Cuesta, Esp.

Vocal: Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

Vocal: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg. Sc.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Aníbal y Morayma, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos Paul, Sebastián y Santiago, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento, gracias. A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todas las personas que han estado conmigo por apoyarme cuando más las necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, de verdad, mil gracias.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, le agradezco a Dios por darme la fuerza y el coraje de hacer este sueño realidad, por darme la sabiduría y paciencia para que fuera posible alcanzar este triunfo.

A mi madre, Morayma Jaramillo, por darme un buen ejemplo, por su amor incondicional y su infinito apoyo porque cuando creí caer tú me enseñaste el camino a seguir. Te quiero, te adoro con todo mi corazón; a mi padre por creer desde el inicio en mí, por su empeño y por ayudarme a ser una mejor persona cada día. Detrás de este logro están ustedes. A mis hermanos y primo Xavier por formar parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. Ustedes saben cuánto costo este trabajo.

A mis primos Edwin, Jheison, Katty y Bethy quien me prestaron el tiempo y el apoyo y ayuda necesaria para poder terminar esta meta y para quienes ningún sacrificio es suficiente.

Gracias a mis abuelitos, quienes me han enseñado el valor de la familia.

A la Universidad Nacional de Loja, y de manera muy especial a cada uno de los Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico los cuales brindaron sus conocimientos y me pude formar para ser un profesional competente

Quiero agradecer de igual manera a la Lcda. Alicia Villavicencio O. por su ayuda y por brindarme sus conocimientos para poder concluir con la presente Investigación.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE.....	vii
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Revisión de literatura.....	7
4.1. Virus del Papiloma Humano.....	7
4.1.1. Principales funciones de las proteínas del VPH.....	8
4.1.2. Ciclo de vida del VPH.....	8
4.1.3. Clasificación del VPH.....	9
4.2. Factores de Riesgo.....	9
4.3. Cáncer Cérvicouterino (CCU).....	10
4.4. Epidemiología del Cáncer Cérvicouterino.....	11
4.5. Métodos de Diagnóstico del VPH.....	13
4.5.1. Frotis de Papanicolaou.....	13
4.5.2. Métodos Moleculares.....	13
4.5.2.1. Hibridación de ácido nucleico.....	14

4.5.2.2. Southern Blot (SB).....	14
4.5.2.3. Dot blot (DT).	14
4.5.2.4. Northern Blot (NB).....	14
4.5.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	15
4.5.2.6. Tipos de técnicas de PCR.	19
5. Materiales y Métodos	21
5.1. Tipo de estudio.....	21
5.2. Área de estudio	21
5.3. Universo.....	21
5.4. Tamaño de la muestra	21
5.5. Criterios de inclusión	22
5.6. Criterios de exclusión	22
5.7. Fase Preanalítica	23
5.8. Fase analítica.....	23
5.9. Fase post-analítica.....	23
5.10. Análisis e interpretación de datos.	24
6. Resultados.....	25
7. Discusión	31
8. Conclusiones.....	33
9. Recomendaciones	34
10. Bibliografía.....	35
11. Anexos	39
Anexo 1. Oficio dirigido al director de la coordinación Zonal 7 para el análisis de muestras de cepillado endo-cervical.....	39

Anexo 2. Oficio dirigido al director de Investigación de la Universidad Nacional de Loja para el procesamiento de muestras.....	40
Anexo 3. Formato de consentimiento informado.....	41
Anexo 4. Transporte de muestras al Laboratorio de Biología Molecular ubicado en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.....	45
Anexo 5. Control interno de DNA	47
Anexo 6. PCR del control positivo de VPH obtenido en el centro de Salud N° 3.....	48
Anexo 7. Protocolo de referencia para estandarización de la PCR.....	49
Anexo 8. Protocolo estandarizado para la PCR en muestras de cepillado endo-cervical. ...	50
Anexo 9. Protocolo de extracción de DNA (Invitrogen PureLink DNA Kits).....	51
Anexo 10. PCR del DNA obtenido para detección de VPH.....	53
Anexo 11. Protocolo para preparación de TBE 10X y 1X.....	55
Anexo 12. Protocolo de electroforesis en geles de agarosa.	56
Anexo 13. Visualización de los productos de PCR en el fotodocumentador ENDURO™ GDS Gel Documentation System – Probiotek	59
Anexo 14. Hoja de registro de resultados	60
Anexo 15. Formato para entrega de resultados.....	62
Anexo 16. Solicitud y hojas de registro de asistencia para socialización de resultados.	63
Anexo 17. Socialización de resultados.....	69
Anexo 18. Evidencia fotográfica.....	70
Anexo 19. Certificación traducción.	72

1. Título

Incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

2. Resumen

Los Virus del Papiloma Humano (VPH) son un grupo de virus de ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, la infección por VPH de las células del epitelio cervicouterino es considerada, en términos biológicos, como una enfermedad de transmisión sexual (ETS) de mayor prevalencia en el mundo entero, por esta razón se formuló como objetivo general determinar la incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja, y como objetivos específicos, estandarizar un método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de VPH en muestras de cepillado endocervical; identificar la presencia de VPH; indicar la frecuencia de VPH por rangos de edad; y socializar los resultados obtenidos con los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico; aplicando un estudio experimental de diseño longitudinal, para el cumplimiento a los objetivos se usó un total de 74 muestras de cepillado endo-cervical. Como resultados se obtuvo la estandarización de la PCR ajustando concentraciones, temperaturas y tiempos para la amplificación de la región L1 del VPH, una incidencia del 45 %, con 34 muestras positivas para VPH. El grupo etario mayormente afectado fue el de edades comprendidas entre 18 – 27 años con un total de 19 casos positivos que representa al 56%, seguido de las edades entre 28 – 37 años que representa un 23 %; los resultados obtenidos en la investigación fueron socializados a estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras Clave: VPH, PCR, cepillado endo-cervical, incidencia.

Abstract

Human Papillomavirus (HPV) is a group of double-chain deoxyribonucleic acid (DNA) viruses belonging to the *Papillomaviridae* family. HPV infection of cervical epithelial cells is considered, in biological terms, as a sexually transmitted disease (STD).) of greater prevalence in the whole world, for this reason the general objective was to determine the incidence of the human papillomavirus in users of the gynecology service of the health center N ° 3 of the Loja city, and as specific objectives, to standardize a Polymerase Chain Reaction (PCR) method for the detection of HPV in endo-cervical brushing samples; identify the presence of the HPV; indicate the frequency of the HPV by age ranges; and to socialize the results obtained with the students and teachers of the Clinical Laboratory career, during the period of July - August of 2018, applying the methodology of experimental study of longitudinal design, a total of 74 endo-cervical brushing samples were used to achieve the objectives. As a result, PCR standardization was obtained by adjusting concentrations, temperatures and times for the amplification of the L1 region of HPV, an incidence of 45%, with 34 samples positive for HPV. The age group most affected was the one between 18 and 27 years old with a total of 19 positive cases representing to 56%, followed by ages between 28 and 37 years old, representing 23%. The results obtained in the research were socialized to students and teachers of the Clinical Laboratory Career.

Key words: HPV, PCR, endo-cervical brushing, incidence.

3. Introducción

La infección genital por Virus de Papiloma Humano (VPH) (proveniente de la familia de los *Papillomaviridae*), durante años había sido considerada como una enfermedad venérea benigna, y recientemente ha recibido mucha atención debido a su relación estrecha con el cáncer genital, así como con lesiones premalignas del cérvix, vagina, vulva, pene y ano. (Trejo, Mendoza, Díaz & Aragón, 2000).

Dada la ubicuidad del virus, la probabilidad acumulada de adquirir una infección cervical por el VPH es muy alta en mujeres sexualmente activas, aproximadamente 50 % de estas mujeres se encuentran infectadas por algún tipo de VPH y de estas se estima que 5-10 % persisten infectadas con cepas oncogénicas del virus. (Allende, 2014).

La infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) de alta incidencia mundial; desempeña un rol importante en la génesis de las lesiones preneoplásicas y del cáncer invasivo de cuello uterino; además del Cáncer Cervicouterino (CCU), también enfermedades benignas como las verrugas, condilomas genitales y patología de las vías aéreas superiores como la papilomatosis respiratoria recurrente. (Vasquez, Rotela & Ortiz, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado tasas de incremento superiores al 5 % desde el año 2007 al 2014 en el mundo entero, a pesar del descenso de las tasas de mortalidad en porcentajes similares a los crecimientos a la infección por VPH, teniendo alta incidencia en los países en vías de desarrollo; inclusive en Latinoamérica se sitúa en el cuarto lugar en el ranking entre los tipos de cáncer, siendo el segundo de mayor prevalencia y causa de defunción femenina en el Ecuador en el 2013. (Organización Mundial de la Salud, 2014).

Una investigación realizada en Nicaragua por Espinoza & Fajardo (2016), en conjunto con la Universidad Centroamericana (UCA) y el Centro de Mujeres Ixchen revela que el 66.5 % de mujeres de los departamentos de Matagalpa y Granada participantes del estudio fueron diagnosticadas con el VPH, principal causante de CCU en el país; señalaron que de las 473 muestras colectadas, 315 arrojaron positivo para VPH, habiéndose detectado 17 casos de mujeres con cáncer cervicouterino.

En Ecuador, el cáncer cervicouterino está subvalorado con cifras de morbi-mortalidad preocupantes. Durante el año 2012, 664 mujeres murieron por cáncer de cuello del útero y la incidencia estimada en Ecuador para 2013 fue de 15.8 casos por cada 100 mil habitantes, según el Registro Nacional de Tumores Solca–Quito, MSP. (Ministerio de Salud Pública, 2014).

Finalmente, en la ciudad de Loja siendo una de las provincias con mayor número de casos de cáncer cervical y desconociendo las causas de su presentación, existen muy pocas investigaciones realizadas que den a conocer números de casos nuevos con respecto a esta infección por lo que se propuso el presente tema de investigación titulado “Incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del Centro de Salud N°3 de la ciudad de Loja” en el periodo julio-agosto de 2018; el grupo de estudio estuvo conformado por mujeres mayores de 18 años con vida sexual activa, de las cuales en base a los criterios de inclusión y exclusión participaron 74 en la investigación.

Para el desarrollo y cumplimiento de la presente investigación, aplicando un estudio experimental de diseño longitudinal, se planteó como objetivo general determinar la incidencia del virus del papiloma humano en el servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja; y como objetivos específicos estandarizar la Reacción en Cadena

de la Polimerasa (PCR) para la detección del virus, detectar su presencia en muestras de cepillado endo-cervical, indicar la frecuencia del virus de acuerdo a rangos de edad, y realizar la socialización de los resultados obtenidos en la presente investigación con los docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

4. Revisión de literatura

4.1. Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de transmisión sexual, que se transmite por contacto genital (como el contacto sexual vaginal y anal) y por contacto cutáneo (piel). Como mínimo, un 50% de las personas que han tenido relaciones sexuales se infectará con el VPH en algún momento de su vida. (American cancer society, 2017).

Los VPH son un grupo de más de 150 virus relacionados, a cada variedad de VPH en el grupo se le asigna un número, lo que es llamado tipo de VPH; los VPH son llamados virus del papiloma debido a que algunos tipos de VPH causan verrugas o papilomas, los cuales son tumores no cancerosos; sin embargo, se sabe que algunos tipos de VPH causan cáncer, especialmente del cuello uterino (la base de la matriz en la parte superior de la vagina). (American cancer society, 2017).

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* e infecta y replica en el núcleo de células epiteliales (piel y mucosas); posee una estructura relativamente simple: una cápside proteica de simetría icosaédrica y en su interior el material genético bajo la forma de ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena circular con 8000 pares de bases; carece de envoltura. (Picconi, 2013).

La organización genética de todos los VPH es similar, formada por tres grandes regiones, una región temprana en la que se encuentran los genes responsables de la transcripción, replicación y transformación, conocidos como genes E (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8), una región tardía, que codifican proteínas de la cápside, L1 mayor y L2 menor, y finalmente una región larga de control, que contiene elementos de regulación para la transcripción y

replicación viral. Es importante señalar que la información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas de DNA, debido a que los genes tienen una sola orientación transcripcional. (Garcia et al., 2014).

4.1.1. Principales funciones de las proteínas del VPH. Las proteínas E1 y E2 transcritas a partir de la región temprana son responsables de la replicación viral y expresión génica. La región tardía codifica para las proteínas L1 y L2, componentes de 95 y 5%, respectivamente, de la cápside viral. Las proteínas E6 y E7, productos de la región temprana, son las encargadas de immortalizar la célula hospedera y del proceso carcinogénico muestra. (Silva et al., 2018).

4.1.2. Ciclo de vida del VPH. Ciclo vital 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 y el DNA viral permanece en estado circular fuera de los cromosomas del hospedero replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división célula. (Sanabria, 2010).

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 ácido ribonucleico mensajero (mRNA) viral durante las diferentes 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 cápsidas 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 para que estos permanezcan en la población general deben completarlo. (Sanabria, 2010).

4.1.3. Clasificación del VPH. Los genotipos de VPH son clasificados como de alto riesgo y de bajo riesgo según su potencial de malignidad, varios estudios deben ser considerados carcinogénicos o de alto riesgo a los tipos VPH 16-18-31-33-35- 39-45-51-52-56-58-59-67-68-73- 82; probablemente carcinogénicos a los tipos VPH 26-53 y 66. Los tipos de VPH de bajo riesgo encontrados comúnmente fueron VPH 6- 11- 40-42- 43- 44- 54-55-57- 61-62-64-69- 70-71- 72- 81- 83-84 y CP6108. (Alfaro & Fournier, 2013).

4.2. Factores de Riesgo

Los VPH se manifiestan con mayor frecuencia en el género femenino en donde la duración de la infección es un componente importante de la tasa de propagación de una enfermedad de transmisión sexual (ETS) en la población, esto es debido a que las infecciones de mayor duración tienen un impacto potencial en el género masculino, que tiene una duración corta porque no puede ser detectada en el primer año; aunque se dispone de cierta evidencia de una mayor persistencia de infecciones masculinas. (Astudillo et al, 2014).

La infección ocurre pronto después del comienzo de la primera relación sexual y la más alta prevalencia se observa en mujeres de menos de 25 años de edad, luego la prevalencia

decrece rápidamente y se dice que las infecciones por VPH son transitorias, pero varios factores incrementan la persistencia. (Sanabria, 2010):

- Promiscuidad: hay una fuerte asociación entre el número de parejas que han tenido tanto la mujer como su compañero a lo largo de su vida y la adquisición del VPH.
- Actividad sexual a temprana edad
- Tener historial de enfermedades transmitidas sexualmente
- Verrugas genitales
- Edad: la infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas, de 18 a 30 años de edad.
- Carga viral: Se correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad.
- Predisposición genética: representa el 27% de factores subyacentes para desarrollo de infección.

4.3. Cáncer Cervicouterino (CCU)

La consecuencia más grave que puede ocasionar la infección por VPH es el cáncer de cuello uterino, especialmente en aquellos casos cuando la mujer no tomó ninguna precaución, inclusive no se realizó los exámenes para la detección precoz del microorganismo, dejando avanzar la misma hasta alcanzar el grado del cáncer. (López & Quiñónez, 2016).

Según GeoSalud, (2013), menciona que el cáncer de cuello uterino es uno de los canceres asociados con la infección del VPH, quien en su prevalencia forman las células en cancerígenas en los tejidos de la mujer, el cual tarda varios años en desarrollarse, por esta cabe la importancia de realizarse un papanicolaou periódicamente para ser detectado y pueda aplicar el tratamiento que ayude a aplacarlo.

El Instituto Nacional del Cáncer, (2014), menciona que el cáncer cervicouterino es el desarrollo crítico de una infección que provoca la deformación de las células a las que se les llama “lesiones” las cuales van avanzando por grados hasta convertirse en cáncer, el cual es causado por algunos tipos de VPH alrededor del 5% de los casos avanza hasta el estado crítico para transformarse en cáncer.

El CCU puede considerarse una enfermedad mortal, inclusive hasta antes del siglo XXI, la mayoría de los casos de esta enfermedad terminaron en el fallecimiento de las personas que se contagiaron con el VPH y desarrollaron el cáncer del cuello del útero, a pesar de que en los últimos ha habido un descenso de la tasa de defunciones por esta patología, continúa siendo una afección grave que incide en el desmejoramiento de los indicadores de salud. (López & Quiñónez, 2016).

4.4. Epidemiología del Cáncer Cervicouterino

Se conoce que para que se dé la transmisión del VPH debe haber contacto sexual con la piel genital, mucosas o líquidos corporales de una pareja con lesiones verrucosas o con infección subclínica; aunque se sabe poco de la capacidad infecciosa del VPH subclínico se cree que es alta, más aún si las cuentas víricas son altas y por medio de un epitelio genital lesionado es posible que durante el acto sexual el VPH tenga acceso a las células basales las cuales se convierten en reservorios del virus una vez que son infectadas, pero puede que la infección de VPH de alto riesgo no se transmite sin previo contacto sexual con penetración, pero en el caso de los serotipos no oncogénicos o de bajo riesgo puede haber infección en vulva o vagina por el uso de tampones o por penetración digital. En teoría es posible la transmisión no sexual de los tipos genitales de VPH, pero se considera rara en adultos sexualmente activos. (Alfaro & Fournier, 2013).

En la década de los 60 del pasado siglo, el peso de las incidencias de las lesiones precancerosas y del cáncer de cérvix se observaba en mujeres de alrededor de los 50 años; en el transcurso de las posteriores décadas se observó que cada vez más se presentaban pacientes femeninas con lesiones precancerosas o en algún estadio clínico del CCU en edades más tempranas. (Zelada & Fando, 2013).

En investigaciones efectuadas en diferentes países como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Francia, Alemania, España, Grecia, Italia, Brasil, Chile, Colombia, México, Argentina, Uganda, Sudáfrica, Corea del Sur y Australia se observó un aumento de la incidencia del VPH, con predominio de las edades comprendidas entre 20 y 30 años, donde las curvas de prevalencia presentaron un pico en las edades de la adolescencia y de la juventud, con un decrecimiento de la curva de prevalencia entre los 35 y 55 años y un aumento del pico en las edades comprendidas entre los 55 y 60 años de edad. (Zelada & Fando, 2013).

Según la Organización Mundial de la Salud (2012), menciona que, el cáncer de cuello uterino constituye en América latina una enorme carga para el sistema de salud, presentándose como la tercera causa de muerte por cáncer en las mujeres de la región, solo superado en por el cáncer de pulmón y de glándula mamaria; aunque en algunos de los países, como Honduras, Nicaragua, El Salvador, Bolivia, Paraguay y Ecuador, aún continúa liderando la mortalidad por cáncer en mujeres, sin embargo una de las localizaciones de cáncer más prevenibles y curables, tal como es evidente en las cifras de cáncer de los países desarrollados; en América latina para el año 2012 deben haber ocurrido casi 70.000 casos y 28.000 muertes por cáncer de cuello uterino representando un 80 %.

4.5. Métodos de Diagnóstico del VPH

4.5.1. Frotis de Papanicolaou. Desde 1940 ha sido una útil herramienta para el diagnóstico de cáncer cervical. Su sensibilidad es de un 50% a un 90%, a pesar de la innovación en las técnicas de detección queda una población de mujeres con frotis de papanicolaou falsos negativos, ya que la identificación de la enfermedad depende de varios factores como la colección de la muestra, la preparación de la misma y la exanimación de las células exfoliadas del cérvix. (Alfaro & Fournier, 2013).

Mediante el papanicolau es posible que se detecte los tipos de VPH de alto riesgo que pueden provocar cáncer cervical, para el proceso de la prueba se toman muestras de células del cuello del útero y se envían a un laboratorio para que sean analizadas a través de un microscopio que reconoce las alteraciones anormales. (López & Quiñónez, 2016).

4.5.2. Métodos Moleculares. Los métodos moleculares que detectan la presencia del VPH identifican el material genético del virus y sus diversos genotipos clasificados según el riesgo de causar lesiones tumorales. La técnica se basa en la complementariedad de los ácidos nucleicos. Una secuencia de DNA tiene la capacidad de hibridar específicamente con otros DNA o RNA de modo tan específico que a una determinada temperatura solamente se formarán híbridos, si el 100% de las bases son complementarias. (Vaca, 2012).

Algunos estudios comparativos, reportan que la sensibilidad del método molecular de diagnóstico es mayor al 90 % comparado con un 68 % en el Papanicolau, sin embargo, cuando se trata de especificidad el papanicolau presenta un 96 % versus el 89 % de los métodos moleculares, por esta razón se considera al diagnóstico molecular como una herramienta, que, junto a la citología y la colposcopia, permite el diagnóstico y control de esta enfermedad. (Garnica, 2011).

4.5.2.1. Hibridación de ácido nucleico. Moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla que son complementarias entre sí formarán híbridos en condiciones apropiadas, en el cual las pruebas de hibridación se basan en este fenómeno y que emplean moléculas etiquetadas (sondas) para detectar moléculas específicas diana complementaria; la hibridación de ácidos nucleicos es el método más sensible para la detección de VPH en muestras clínicas y el único capaz de identificar los tipos específicos del VPH, existen muchos formatos de ensayo de hibridación alternativos; la hibridación Southern blot sigue siendo la prueba más sensible y específica para el DNA del VPH, pero tiene el inconveniente de ser también el que más tiempo consume. (Astudillo et al, 2014).

4.5.2.2. Southern Blot (SB). Esta es una técnica que fija el DNA reconocido por enzimas de restricción a un soporte y realiza en él la hibridación con sondas específicas, se basa en la separación del DNA por migración electrónica a través de un polímero (agarosa) el cual es transferido y fijado en una membrana de nitrocelulosa. Esta técnica permite identificar la ubicación de una secuencia blanco específico. (Garnica, 2011).

4.5.2.3. Dot blot (DT). En esta técnica se utiliza la separación electroforética que permite estimar cuantitativa y cualitativamente el antígeno, los productos de la PCR son hibridados con cocteles de sondas específicas para VPH, los productos de la PCR absorbidos, desnaturalizados y fijados sobre una membrana de nylon son incubadas con sondas marcadas con enzimas que al estar incubadas con un sustrato dan una reacción colorimétrica. (Garnica, 2011).

4.5.2.4. Northern Blot (NB). Esta técnica fija el RNA digerido por enzimas de restricción a un soporte solido realizando en el la hibridación con sondas específicas, se basa en la separación del DNA por migración electroforética a través de un polímero (agarosa) luego es

transferido y fijado a una membrana de nitrocelulosa, por ello es importante en la regulación de la expresión génica, identificación y cuantificación de un mRNA transcrito de un gen particular y el efecto de cambios que pueden influir en la expresión, es un proceso que detecta RNA blanco utilizando una sonda marcada de DNA o RNA. (Garnica, 2011).

4.5.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las técnicas de detección y genotipificación de VPH se basan principalmente en la amplificación del genoma del virus mediante PCR, para posteriormente desarrollar un método complementario que permita discriminar, ya sea, los grupos de VPH de alto o bajo riesgo, o los genotipos individuales muestra. (Silva et al., 2018).

La idea básica de la técnica de PCR es sintetizar muchas veces un fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido como taq polimerasa; cuando hacemos una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el DNA molde, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la replicación, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (pH óptimo, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂ o KCl dependiendo de la enzima). (Espinoza, 2007).

La PCR es una técnica molecular poderosa, se ha utilizado en el campo del diagnóstico desde sus inicios por su sensibilidad y especificidad, capaz de detectar entre 10 y 200 copias de genoma viral por muestra; esta técnica es capaz de detectar el DNA diana mediante la

utilización de oligonucleótidos iniciadores que complementan de forma específica con las regiones flanqueantes del ADN a amplificar. (Astudillo et al, 2014).

Los componentes se describen a continuación (Vaca, 2012):

- **Enzima DNA Polimerasa:** La DNA polimerasa es la enzima encargada de la adición de nucleótidos en sentido 5'-3', catalizando un ataque nucleofílico del átomo de fósforo del desoxirribonucleótido (dNTP) al terminal 3' OH del primer, dando lugar a la unión covalente fosfodiéster entre ambos, permitiendo la elongación de la cadena complementaria a la cadena molde en la reacción.
- **Cebadores, primers o iniciadores:** Se debe seleccionar dos primers que hibriden regiones del DNA molde, y que estén localizados a los extremos de la región de interés y que sean "únicos" para obtención el fragmento deseado. La longitud del oligonucleótido debe ser de 15 a 30 nucleótidos. La distancia de los primers en la secuencia es variable, sin embargo, la experiencia muestra que fragmentos cortos amplifican mejor que fragmentos largos mostrando que la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente
- **Nucleótidos:** la concentración de cada dNTP en la PCR debe ser equitativa y no debe exceder de 200 μM , valor suficiente para la síntesis de 12,5 μg de DNA. Un exceso de dNTPs puede inhibir la actividad enzimática y puede dar como resultado la amplificación de falsos productos; sin embargo, al variar los valores de dNTPs se debe recordar que el ion magnesio actúa como quelante, decreciendo su concentración en la reacción.

- **Cloruro de Magnesio:** el ion magnesio es un cofactor requerido para la reacción enzimática. La concentración del ion magnesio puede afectar al alineamiento de los primers, producción inespecífica de amplificadores y formación de dímeros de primers influyendo sobre la actividad de la DNA polimerasa.
- **Solución tampón:** la solución buffer estándar para la reacción comprende Tris-HCl en concentración 10 a 50 mM: El pH óptimo para la mayoría de las polimerasas termófilas se encuentra entre 8 a 9. La solución incluye una sal, que puede corresponder a un ion de potasio o sodio, para facilitar el correcto alineamiento de los cebadores.

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los primers al molde. Los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios, el proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación. (Perez, 2012).

En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen, esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94 °C; el siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde; esta segunda fase se conoce como hibridación; temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60 °C Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los primers, la temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima

polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72 °C. Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR. (Perez, 2012).

En la PCR convencional el DNA se detecta mediante la iluminación de un gel de agarosa por luz UV, mientras que en la PCR en tiempo real o cuantitativa (*quantitative*, qPCR), la detección se basa en la fluorescencia acumulada a lo largo de los ciclos de amplificación. La fluorescencia, directamente relacionada con la cantidad de amplicones, puede ser generada por agentes intercalantes como SybrGreen o por la liberación de los fluoróforos de las sondas de nucleótidos específicos. El ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct) es la medida cuantitativa que identifica el ciclo de amplificación en el cual la cantidad de fluorescencia es superior a un determinado umbral. Además, el análisis de las temperaturas de fusión, una característica única de la química de SybrGreen, incrementa el poder de discriminación entre secuencias. (Davies et al., 2014).

La alta sensibilidad de la técnica permite detectar hasta 3,9 copias del DNA viral al comienzo de la reacción. Por otro lado, la utilización de partidores de consenso que amplifican zonas de la región L1 del genoma viral, permiten la detección y posterior tipificación de los diferentes genotipos virales a partir de la amplificación del DNA de una única muestra. (Silva et al., 2018).

En la mayoría de los casos, las infecciones por VPH son subclínicas (fase latente) y es difícil detectarlas por examen citológico, histopatológico o por técnicas inmunohistoquímicas. Por esta razón los métodos moleculares como la PCR son recomendados para tamizaje. Se puede utilizar además, sondas de hibridación o ELISA, para aumentar la sensibilidad y especificidad de los productos de PCR, las que combinadas con el uso de enzimas de restricción (RFLP) y secuenciación, identifican en caso de ser necesario,

los distintos genotipos virales. La estrategia de diagnóstico es seleccionar genes de VPH de consenso altamente conservados para la detección de la mayoría de los tipos virales del VPH; luego, utilizando pequeñas diferencias en la secuencia del DNA, lograr la tipificación viral. (Melo A et al., 2003).

4.5.2.6. Tipos de técnicas de PCR. (Espinoza, 2007):

- PCR para la amplificación de un solo sitio conocido del genoma (locus). Estas PCR requieren conocer la secuencia que se trabaja, en cuyo caso se utilizan oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de ese gen y se obtiene un solo fragmento de un tamaño ya conocido. Con este tipo de PCR se puede utilizar enzimas de restricción para generar patrones de cada individuo, aunque lo ideal es obtener la secuencia completa del gen que amplificamos, sobre todo cuando se desea responder a preguntas relacionadas con las fuerzas evolutivas que han actuado sobre él.
- PCR en los que no es necesario conocer la región que se está amplificando (se amplifican regiones no conocidas, como zonas hipervariables del genoma), por lo cual no se sabe el tamaño del fragmento (o fragmentos) que se esperan. Éstos se utilizan para determinar polimorfismo genómico y son los más comunes para fingerprint, ya que es sencillo obtener los datos (un gel de agarosa después del PCR es suficiente), se observan varios loci simultáneamente y la información de las zonas variables permite inferir los datos necesarios para análisis de genética de poblaciones. En general este tipo de PCR utiliza un solo oligonucleótido con 2 características importantes: que sea de pequeño a mediano (de 6 a 18 bases) y sobre todo que su secuencia esté presente muchas veces en el DNA del organismo que estudiamos. Existen zonas repetidas hipervariables del DNA que pueden amplificarse de esta manera.

En la mayoría de los casos, las infecciones por VPH son subclínicas (fase latente) y es difícil detectarlas por examen citológico, histopatológico o por técnicas inmunohistoquímicas. Por esta razón los métodos moleculares como la PCR son recomendados para tamizaje. Se puede utilizar, además, sondas de hibridación o ELISA, para aumentar la sensibilidad y especificidad de los productos de PCR, las que combinadas con el uso de enzimas de restricción (RFLP) y secuenciación, identifican en caso de ser necesario, los distintos genotipos virales. La estrategia de diagnóstico es seleccionar genes de VPH de consenso altamente conservados para la detección de la mayoría de los tipos virales del VPH; luego, utilizando pequeñas diferencias en la secuencia del DNA, lograr la tipificación viral. (Melo A et al., 2003).

5. Materiales y Métodos

5.1. Tipo de estudio

Estudio experimental de diseño longitudinal.

5.2. Área de estudio

El presente proyecto se llevó a cabo en el centro de salud N°3 de la ciudad de Loja ubicado en las calles Santo Domingo entre Riobamba y Quevedo, junto a la Coordinación Zonal 7 – Salud.

5.3. Universo

La investigación estuvo conformada por usuarias mayores de 18 años, que asisten al servicio de ginecología del centro de salud N° 3 de la ciudad de Loja, el cual registra 80 pacientes en el periodo Julio-Agosto de 2017.

5.4. Tamaño de la muestra

74 muestras de cepillado endocervical que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión.

El cálculo del tamaño de la muestra se lo realizó en base a la fórmula para la estimación del muestreo, con un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 3%.

Dónde:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 N \times p \times q}{e^2(N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

n= tamaño de la muestra

N= 80 usuarias del área de ginecología

$Z_{\alpha} = 1.96$ Nivel de confianza del 95%

p: 0.5

q= 0.5

e= error seleccionado de 3% = 0.03

$$n = \frac{1,96^2 \cdot 80 \times 0,5 \times 0,5}{0,03^2(79) + 1,96^2 \times 0,5 \times 0,5}$$

$$n = \frac{3,8416 \times 80 \times 0,25}{0,0009 \times (79) + 3,8416 \times 0,25}$$

$$n = \frac{76,8}{0,0711 + 0,9604}$$

$$n = \frac{76,8}{1,03}$$

$$n = 74$$

5.5. Criterios de inclusión

- Mujeres con vida sexual activa mayores de 18 años.
- Muestras representativas para extracción de DNA (moco, abundante muestra).
- Mujeres que hayan aceptado ser parte de la investigación mediante el consentimiento informado.

5.6. Criterios de exclusión

- Mujeres con diagnóstico de VPH.

5.7. Fase Preanalítica.

- Oficio dirigido al director de la Coordinación Zonal 7 para la recolección de muestras de cepillado endocervical (Anexo 1).
- Oficio dirigido al director de Investigación de la Universidad Nacional de Loja para el procesamiento de muestras (Anexo 2).
- Formato de consentimiento informado. (Anexo 3).
- Protocolo de transporte de muestras al Laboratorio de Biología Molecular ubicado en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja (Anexo 4).

5.8. Fase analítica.

- Protocolo para el Control interno de DNA. (Anexo 5).
- Protocolo para PCR del control positivo de VPH obtenido en el centro de Salud N° 3. (Anexo 6).
- Protocolo de referencia para estandarización de la PCR. (Anexo 7).
- Protocolo estandarizado para la PCR de punto final de muestras de cepillado endocervical. (Anexo 8)
- Protocolo de extracción DNA de las muestras obtenidas. (Anexo 9).
- Protocolo para la PCR del DNA obtenido para detección de VPH. (Anexo 10).
- Protocolo para preparación de TBE 10X y 1X. (Anexo 11).
- Protocolo de electroforesis de los amplicones obtenidos durante la PCR. (Anexo 12).

5.9. Fase postanalítica.

- Visualización de los productos de PCR en el fotodocumentador ENDURO™ GDS Gel Documentation System – Probiotek. (Anexo 13).

- Hoja de registro de resultados obtenidos. (Anexo 14).
- Formato para entrega de resultados. (Anexo 15).
- Solicitud y hojas de registro de asistencia para socialización de resultados. (Anexo 16)

5.10. Análisis e interpretación de datos.

El programa estadístico para el procesamiento y análisis de resultados se usó el programa Microsoft Excel 2016, realizando el respectivo análisis a base de gráficas y tablas de los resultados obtenidos en la investigación en función de los objetivos establecidos.

6. Resultados

Tabla N° 1

Estandarización de la PCR para la detección del virus del papiloma humano en muestras de cepillado endocervical.

Se estandarizó la PCR para la detección de VPH, en la cual se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar las concentraciones, cantidades de reactivos, temperaturas y tiempos para la amplificación de la región L1 de VPH con primers MY011/09 con un tamaño de 450 pb, basándose con los parámetros del protocolo de referencia. (Anexo 8).

CONCENTRACIONES Y VOLÚMENES							OBSERVACIONES
Reactivo	PROTOCOLO DE REFERENCIA			ESTANDARIZACIÓN		Volumen	
	Concentración inicial	Concentración final	Volumen	Concentración inicial	Concentración final		
Buffer	10x	1x	2.5ul	10x	1x	2.5ul	
MgCl ₂	50mM	1.5mM	0.8ul	10mM	1.5mM	3.8ul	
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5ul	10mM	0.4mM	1ul	Los dNTPs se comportan como quelantes del catión Mg ₂₊ , el aumento nos permite conseguir la cantidad de DNA necesaria
MY11	10uM	0.2uM	0.5ul	10uM	0.4uM	1ul	Se observa un aumento en la concentración de primers para aumentar la especificidad de unirse a la secuencia específica
MY09	10uM	0.2uM	0.5ul	10uM	0.4uM	1ul	
Taq DNA recombinante	5U/ul	0.4U	0.08ul	5U/ul	2.5U	0.5ul	El añadir mayor cantidad de enzima nos aseguró un mayor rendimiento de la reacción, con el fin de tener una alta fidelidad de amplificación
DNA		100ng/200ng			30ng		Esta disminución de la concentración es debido a que al realizar la estandarización a menor concentración de DNA se obtiene una mejor calidad de banda, como también a que a mayor cantidad

de DNA puede inhibir la reacción.

Agua	Ajustar al volumen final de 25ul.	Ajustar al volumen final de 25ul.
Volumen total	25ul	25ul

TEMPERATURAS Y TIEMPOS

PROTOCOLO DE REFERENCIA			ESTANDARIZACIÓN			OBSERVACIONES
Temperatura	Tiempo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Repeticiones	
94°C	2 min	1x	94°C	5 min	1x	Mayor tiempo de separación de las cadenas y tiempo recomendado en la literatura y tiempo máximo para evitar el bajo rendimiento de la enzima
94°C	1 min		94°C	1 min		
50°C	1 min	40x	40°C	1 min	40x	La temperatura de hibridación se disminuye para la especificidad de la reacción a las concentraciones utilizadas en los primers.
72°C	1 min		72°C	1 min		
72°C	10 min	1x	72°C	10 min	1x	
4°C	∞	1x	4°C	∞	1x	

Elaborado por: Joffre Andrés Toledo Jaramillo

Tabla N° 2

Identificación de la presencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

	Frecuencia	Porcentaje
CASOS POSITIVOS	34	45,9 %
CASOS NEGATIVOS	40	54,1 %
TOTAL DE POBLACIÓN	74	100%

Fuente: Hoja de registro de resultados.

Elaborado por: Joffre Andrés Toledo Jaramillo.

Interpretación. - De 74 muestras de cepillados endocervical analizadas en el 45.9 % (34) hubo presencia de VPH, mientras que el 54,1 % (40) de las muestras dio un resultado negativo; esto nos puede indicar que la infección por VPH sigue siendo una enfermedad silenciosa que ataca a diario a mujeres que tienen escaso conocimiento sobre las medidas de prevención o el tratamiento para el mismo, al tener múltiples parejas sexuales, o el inicio de la vida sexual a temprana edad.

Tabla N° 3

Frecuencia del virus del papiloma humano por rangos de edad en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

Edad	Frecuencia	Porcentaje
18 – 27	19	56 %
28 – 37	8	23 %
38 – 47	4	12 %
48 – 57	2	6 %
>58	1	3 %
Total	34	100 %

Fuente: hoja de registro de resultados.

Elaborado por: Joffre Andrés Toledo Jaramillo.

Interpretación: De las 34 muestras positivas para VPH, se observó mayor frecuencia del virus en el grupo de edades comprendidas entre 18 – 27 años con 19 casos lo que representa un 56 %, seguido de las edades entre 28 – 37 años con 8 casos que representan un 23 % de casos nuevos de VPH, lo que permite indicar que para la adquisición del virus no es preciso tener una edad en específico, ya que esta afección se puede presentar desde el momento que inicia su vida sexual, algunos autores incluso consideran la edad uno de los factores de riesgo asociados a la infección viral, es decir cuando se inicia la práctica sexual antes de los 18 años debido a la vulnerabilidad del epitelio cervical en esa edad. (López & Quiñónez, 2016).

Determinación de la incidencia del virus del papiloma humano en el servicio de ginecología del centro de Salud N°3 de la ciudad de Loja.

$$Tasa\ de\ Incidencia = \frac{I}{PT}$$

Dónde:

I = Número de casos nuevos de enfermedad o evento

PT= Número de personas en riesgo de desarrollar la enfermedad por el tiempo que cada una de ellas permanece en riesgo.

$$Tasa\ de\ Incidencia = \frac{34}{74} \times 100$$

$$Tasa\ de\ Incidencia = 0,45 \times 100$$

$$Tasa\ de\ Incidencia = 45\%$$

Interpretación: La incidencia de VPH fue de 45 % que corresponde a 45 casos nuevos, del total de usuarias con riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino durante el periodo Julio-Agosto 2018, lo que nos indica una incidencia considerablemente elevada en relación al año anterior en donde no existió ningún caso registrado con VPH.

Socializar los resultados obtenidos con los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

Para realizar la socialización de los resultados se invitó a los docentes y estudiantes de la carrera en el aula Magna de la Facultad de Salud Humana, dando a conocer lo obtenido en el presente trabajo de investigación, con el fin de que los estudiantes tengan el interés en estos temas de investigación. (Anexo 17).

7. Discusión

La infección genital por virus de papiloma humano (VPH) ha recibido recientemente mucha atención debido a su relación estrecha con el cáncer genital, así como con lesiones premalignas del cérvix, vagina, vulva, pene y ano. (Trejo, Mendoza, Díaz & Aragón, 2000)

Los resultados de la presente investigación fueron obtenidos mediante PCR de punto final, en la cual se realizó la estandarización de la técnica para la detección de VPH utilizando primers MY011/09, amplificando la región L1 con un tamaño de 450 pb, los cuales detectan una amplia gama de VPH, ajustando cantidades y concentraciones de primers a 0.4 μ M, de dNTPs a 0.4 mM, y de Taq polimerasa a 2.5 U; en cuanto a tiempo de desnaturalización elevándola a 5 minutos y temperatura de hibridación disminuyéndola a 40 °C; en la investigación realizada en el servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la Ciudad de Loja se obtuvo que de un total de 74 muestras de cepillado endo-cervical, 34 muestras presentaron amplificación para la región L1 de VPH, lo que representa una tasa de incidencia del 45 %. El grupo etario mayormente afectado fue el de edades comprendidas entre 18 – 27 años con un total de 19 casos positivos que representa el 56 %, seguido de las edades comprendidas entre 28 – 37 años con 8 casos positivos que representa un 23 %.

En los resultados obtenidos en la investigación realizada por Suárez A y colaboradores (2006), titulada “Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales”, se obtuvo que de 281 muestras analizadas, 117 presentaban VPH con una incidencia del 41.6 %, un dato cercano al de la presente investigación en la cual se observó una incidencia del 45 % con 34 casos nuevos, este alto porcentaje de infección por VPH puede deberse a que actualmente existe un brote de la infección por VPH debido a la migración existente en el último año donde cuyas personas pueden tener la infección,

además de tener relaciones sexuales sin protección o por tener múltiples parejas sexuales que aumentan el número de casos nuevos de VPH a nivel local.

En un estudio realizado por Sulcahuaman Y. y colaboradores (2015), titulado “Características sociodemográficas de mujeres peruanas con virus papiloma humano detectado por PCR-RFLP” Se encontró el 32,5% de muestras analizadas con presencia del DNA de VPH, estos resultados difieren con el obtenido en la presente investigación donde el número de casos nuevos de VPH es del 45 %, como puede observarse a pesar de la variación porcentual con respecto al presente estudio pero siguen siendo datos preocupantes en la población femenina debido a que existen aumentos de los casos que probablemente se dé por la alta migración existente en los diferentes países de la región, además de tener historial de enfermedades de transmisión sexual, facilitando la infección por VPH.

En el estudio realizado por López & Quiñónez (2016) en la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, de las 100 mujeres con VPH estudiadas, el 32 % corresponde a edades comprendidas entre los 20 -25 años y el 28% entre 26 a 30 años de edad. Así mismo, en otro estudio realizado por Peña (2013) en la Universidad de las Américas, se observó una mayor incidencia de VPH con el 44 % en mujeres de 20 – 25 años de edad y el 33 % entre 26 – 30 años. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, ya que el grupo más afectado por VPH corresponde al de mujeres jóvenes (18-27 años) con el 56 % el cual nos indica que las mujeres jóvenes en los grupos de estudio son las que tienen mayor número de casos de VPH con respecto a las demás, por lo que se considera que la edad es uno de los factores de riesgo más elevados asociados a la infección viral, lo que significa que cuando se inicia la práctica sexual antes de los 18 años la infección es más alta debido a la vulnerabilidad del epitelio cervical en esas edades.

8. Conclusiones

- La incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de Salud N°3 de la ciudad de Loja fue del 45 %.
- Se estandarizó un método de PCR de punto final para la detección del virus del papiloma humano en muestras de cepillado endo-cervical, mediante la modificación de concentraciones en primers a 0.4 uM, dNTPs a 0.4 mM y taq polimerasa a 2.5 U; tiempo de desnaturalización a 5 min y disminución de temperatura de hibridación a 40 °C.
- La presencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología fue de 34 casos positivos durante el periodo de Julio – Agosto del 2018.
- Se obtuvo 19 casos positivos de VPH en mujeres de edades comprendidas entre los 18 -27 años y 8 casos positivos en las edades de 28 – 37 años.
- Se socializó los resultados obtenidos con los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

9. Recomendaciones

- Se recomienda dar continuidad a la presente investigación, mediante la genotipificación de las muestras positivas para VPH, para tener conocimiento sobre qué genotipo del virus predomina a nivel local, lo que contribuiría en el tratamiento, seguimiento y mejora de la salud de las usuarias del servicio de ginecología.
- Es importante la ampliación de la presente investigación a los demás centros de salud de la ciudad de Loja lo cual nos permitirá conocer los números de casos de VPH a nivel Local y el mayor control de la infección al ser un problema de salud pública.

10. Bibliografía

- Alfaro, A., & Fournier, M. (2013). Virus del papiloma humano. *Revista Médica De Costa Rica*, 211-217. Obtenido de <https://bit.ly/2t4U9jo>
- Allende, C. (2014). Virus del papiloma humano subclínico con cepillado uretral, en el varón sexualmente activo (PostGrado). Universidad Veracruzana
- American cancer society. (2017). El VPH y las pruebas para el VPH. Estados Unidos. Obtenido de <https://bit.ly/2RuLqQP>
- Astudillo, O., Flores, C., & Espinoza, M. (2014). Diagnóstico molecular del virus del papiloma humano. *Panorama Medico*, (1). Cuenca. Obtenido de <https://bit.ly/2McKpJw>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). El VPH y los hombres. EE.UU. Obtenido de <https://bit.ly/2gNpa73>
- Davies, C., Poma, R., Marino Cardozo, R., Mora, M., Ramos, F., Rajal, V., & Basombrío, M. (2014). Detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real. Obtenido de <https://bit.ly/2x2mFmT>
- de Sanjosé, S., & Garcia, A. (2006). Epidemiología de la infección por el virus del papiloma humano y cancer de cervix (1st ed.). Barcelona: EMISA. Barcelona, España. Obtenido de <https://bit.ly/2rfqth7>

- Espinoza, L. (2007). Guia práctica sobre la técnica de PCR. In L. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre, *Ecología molecular* (1st ed., pp. 517 - 521). México: Instituto Nacional de Ecología. Obtenido de <https://bit.ly/2r23JRq>
- Espinoza, S., & Fajardo, G. (2016). Análisis de la situación del virus VPH, causante del cáncer cérvico uterino en mujeres jóvenes de las ciudades de Granada y Matagalpa. *Revista UCA*.
- Garcia, C., & Carmen, G. (2014). VPH y los Carcinomas de Cavidad Bucal y Bucofaringe. Mexico DF, Mexico. Obtenido de <https://bit.ly/2BKPUgC>
- Garnica, F. (2011). Utilidad de la pcr para la deteccion del virus del papiloma humano en pacientes con citologia asc-us. Bogotá, Colombia. Obtenido de <https://bit.ly/2KOotp5>
- Instituto Nacional del Cancer. (2015). Virus del papiloma humano y el cancer. Estados Unidos. Obtenido de <https://bit.ly/2wXLKOV>
- López, N., & Quiñónez, V. (2016). Incidencia del virus del papiloma humano en mujeres de 20 a 40 años de edad en centro de salud de la ciudad de Guayaquil (Pregrado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil
- Melo A, Angélica, Montenegro H, Sonia, Hooper, Terryl, Capurro V, Italo, Roa S, Juan Carlos, & Roa E, Iván. (2003). Tipificación del virus papiloma humano (VPH) en lesiones preneoplásicas y carcinoma del cuello uterino en mujeres de la IX Región-Chile. *Revista médica de Chile*, 131(12), 1382-1390 Obtenido de <https://bit.ly/2wVIUK5>
- Ministerio de Salud Pública. (2014). Vacuna contra el virus del papiloma humano previene cáncer uterino en el Ecuador. Quito. Obtenido de <https://bit.ly/2QDauYJ>

Palacios, V. (2001). Problemática actual del VPH y su prevención (Vol. 1). Oviedo, España.

Obtenido de <https://bit.ly/2MWXVkJ>

Peña, R. (2013). Incidencia de diagnósticos y conocimientos sobre los factores de riesgo que contribuyen en el contagio de VPH en mujeres de 20-40 años que acuden al centro de salud #1(Licenciatura). Universidad de las Américas.

Pérez, A. M. (2012). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Valencia, España. Obtenido de <https://bit.ly/1PUOu4o>

Picconi, M. (2018). Detección de virus papiloma humano en la prevención del cáncer cérvico-uterino. Obtenido de <https://bit.ly/2CI6m3U>

Reyna López, L., Gonzalez Cabeza, J. G., & Araujo Jimenez, A. (2015). Detección y genotipificación de papiloma virus humano por PCR-RFLP. Moche, Perú. Obtenido de <https://bit.ly/2QfvNME>

Sanabria, J. (2010). Human Papilloma virus. Cuba. Obtenido de <https://bit.ly/1a2XH7Z>

Silva, Ramón, León, Daniela, Brebi, Priscilla, Ili, Carmen, Roa, Juan C, & Sánchez, Raúl. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. Revista chilena de infectología, 30(2), 186-192 Obtenido de <https://bit.ly/2wUE293>

Suárez, A., Esquivias, J., Vidart, J., & Picazo, J. (2006). Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. Revista Española De Quimioterapia, (6), 163. Obtenido de <https://bit.ly/2rcEXhQ>

Trujillo Perdomo, Tania de la C, Domínguez Bauta, Susana R, Ríos Hernández, María de los A, & Hernández Menéndez, Maite. (2017). Prevalencia del virus del papiloma

- humano en mujeres con citología negativa. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 43(1) Obtenido de <https://bit.ly/2zsnrej>
- Trejo, Ó., Mendoza, G., Díaz, J., & Aragón, M. (2000). Detección del virus de papiloma humano en el varón con cepillado uretral. *UNAM*, (3ra), 77. Obtenido de <https://bit.ly/2QjoNh7>
- Vaca, D. (2012). Identificación del Virus del Papiloma Humano mediante PCR-RFLP y posterior genotipificación en muestras de tejido cervical parafinado con diagnóstico histopatológico de cáncer in situ procedentes del Hospital de SOLCA Núcleo Quito (PostGrado). Escuela Politécnica del Ejército.
- Vasquez, W., Rotela, V., & Ortiz, Y. (2017). Virus del papiloma humano: Revisión de la Literatura. *Ciencia E Investigación Medico Estudiantil Latinoamericana*, 22(1). doi: 10.23961/cimel.v22i1.749
- Venceslau, E., Bezerra, M., Lopes, A., Souza, É., Onofre, A., & Melo, C. et al. (2014). HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *Jornal Brasileiro de Patología e Medicina Laboratorial*, 50(4), 280-285 Obtenido de <http://ref.scielo.org/d4g795>
- Zapata, K. (2014). Propuesta de programa educativo para la prevención del virus de papiloma humano en mujeres adolescentes Yaruquíes (Pregrado). ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Zelada, A., & Fando, R. (2013). La pandemia subvalorada del siglo XXI: el virus del papiloma humano. Su repercusión en la patogenia del cáncer cervicouterino. *Revista CENIC*, 44(2). Obtenido de <https://bit.ly/2Rtxt5r>

11. Anexos

Anexo 1. Oficio dirigido al director de la coordinación Zonal 7 para el análisis de muestras de cepillado endocervical.

Loja, 07 de septiembre de 2018

Ingeniero
Mauro Castro Guerrero
DIRECTOR DISTRITAL 11D1 LOJA SALUD
PRESENTE

De mi consideración:

Yo, Joffre Andres Toledo Jaramillo, tesista de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, me encuentro desarrollando mi tesis de grado con el tema " INCIDENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN USUARIAS DEL AREA DE GINECOLOGIA DEL CENTRO DE SALUD Nro. 3 DE LA CIUDAD DE LOJA", desde el periodo comprendido desde el 16 de julio al 24 de agosto del 2018, por tal motivo me permito solicitar su autorización para revisar las muestras de cepillado endo-cervical para la detección del virus del papiloma humano en el centro de salud Nro. 3 de su distrito que usted representa.

Razón por la cual espero contar con su autorización para llevar a cabo la actividad antes mencionada, conocedor de su alto espíritu de colaboración le anticipo mis sinceros agradecimientos.

Atentamente,


Joffre Andres Toledo Jaramillo
TESISTA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA


DIRECCION DISTRITAL DE SALUD N° 11D01
GESTION DOCUMENTAL
RECEPCION DE DOCUMENTOS
FECHA: 07-09-2018
HORA: 14:30
RESPONSABLE

Anexo 2. Oficio dirigido al director de Investigación de la Universidad Nacional de Loja para el procesamiento de muestras.

Loja, 20 de Noviembre del 2017

Dr. Nikolay Aguirre Mendoza, Ph. D.

DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

De mis consideraciones:

Yo, Joffre Andres Toledo Jaramillo, con C.I 1104837107 estudiante del VIII ciclo de la carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, solicito de la manera más comedida se digne autorizar la realización de mi proyecto titulado: **“Determinación de la prevalencia del virus del papiloma humano mediante técnica de PCR en mujeres de la ciudad de Loja.”**, para el desarrollo del mismo requiero realizar el procesamiento de las muestras en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

Esperando ser atendida favorablemente, le antelo mi sincero agradecimiento.

Muy atentamente,



Joffre Andres Toledo Jaramillo

Solicitante



VTO. BUENO
Dirección de Investigación UNL
Fecha: 20-11-2017

Anexo 3. Formato de consentimiento informado.



Instituto Nacional
de Investigación
en Salud Pública INSPI

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN



Instituto Nacional
de Investigación
en Salud Pública INSPI
Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

Consentimiento informado

Título del Protocolo: Dinámica de infección del Virus de Papiloma Humano y de otras infecciones de transmisión sexual en mujeres de la provincia de Loja.

Investigador Principal: Dr. Franklin Román Cárdenas MgSc

Organización del investigador: Universidad Nacional de Loja, Centro de Biotecnología

Co-investigadores: Dra. Anabella Ríva
Dr. Amable Bermeo
Dra. Fabiola Barba
MgSc. Cesar Bedoya Pilozo
Msc. Yasel Manuel Santiesteban Díaz
MgSc. Paola Dalgo Aguilar
BqF María Esther Romero
Dr. Alberto Orlando
Dr. Alonzo Alfaro
Dra. Jhomar Rivera
Blga. Katty Ojeda
Dra. Maylen Espinoza

OBJETIVO

Usted ha sido seleccionado/a para participar en el estudio **Dinámica de infección del Virus de Papiloma Humano y de otras infecciones de transmisión sexual en mujeres de la provincia de Loja**. Su objetivo es entender mejor la infección del Virus de Papiloma Humano y de otras infecciones de transmisión sexual en las mujeres de la provincia de Loja. Los resultados se utilizarán para lograr que las autoridades de salud de la provincia de Loja y de la región 7 le presten atención a este tema e implementen estrategias de intervención a fin de combatir esta enfermedad. Todo el proceso será totalmente anónimo en ningún momento se utilizarán sus datos personales. Preservaremos estrictamente sus derechos a la privacidad y la confidencialidad.

Su participación en este proyecto de investigación es completamente voluntaria. Usted puede retirarse del mismo en cualquier momento. La no participación en el estudio no influye para nada en la futura atención médica o el tratamiento que recibe.



CONTACTOS DEL ESTUDIO

Si en cualquier momento tiene preguntas respecto a este proyecto, puede comunicarse con:

- Dr. Franklin Román Cárdenas, Tel: 072 547058, 0992088936 Email: franklin.roman@unl.edu.ec
- MgSc. Cesar Bedoya Piloza Tel: 0991107024, 281200 o 282281 EXT: 128 Email: cbedoya@inspi.gob.ec

Estarán a su disposición para responder a sus preguntas e inquietudes.

PROCEDIMIENTOS

A cada participante del estudio le será aplicado un sencillo cuestionario en no más de 10 minutos que tiene como objetivo describir la conducta sexual que usted ha mantenido durante su vida. Usted tiene el derecho de abstenerse a contestar las preguntas que no desea, simplemente indicándoselo al entrevistador/a. Si usted está de acuerdo en participar, firmará el acta de consentimiento. Sus respuestas serán introducidas en una base de datos la cual identificará a cada participante con un código. Estos códigos serán destruidos a más tardar un año después que el estudio termine. Solamente los investigadores del estudio, estarán autorizados a tener acceso a esta base de datos.

POSIBLES RIESGOS

El procedimiento de este estudio no es invasivo, por lo que no será necesario tomar muestras de sangre ni otros exámenes complementarios, ni tendrá que ingerir ningún medicamento u otras sustancias. El mayor riesgo pudiera estar en la pérdida de confidencialidad o privacidad. Para garantizar que esto no suceda, el equipo de investigación manejará su información con estricta confidencialidad. También puede existir riesgo de incomodidad asociado con contestar preguntas sobre cuestiones personales. El equipo de investigación será respetuoso de su decisión de no compartir esta información.

BENEFICIOS

Aunque usted no obtiene un beneficio directo por participar en esta investigación, el estudio de sus experiencias contribuirá a entender mejor la infección del Virus de Papiloma Humano y de otras infecciones de transmisión sexual en las mujeres de la provincia de Loja, así como la conducta sexual que está permitiendo que cada día se infecten muchas mujeres con este virus. Usted contribuirá en la mejora de la proyección integral de la prevención en el país y por lo tanto en un mediano



plazo se prevé disminuyan los casos de infecciones y el gasto público dedicado al tratamiento y atención de esta enfermedad.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Solamente el equipo de investigación estará autorizado a manejar los documentos que contienen los identificadores personales. Los números identificadores serán borrados de la base de datos un año después de terminar el estudio. No hay una fecha programada para que el resto de la base de datos sea destruida, porque la investigación es un proceso continuo y la información puede ser utilizada en proyectos futuros de investigación, siempre que sea autorizado por los comités de ética correspondientes. Es también posible que los archivos de esta investigación sean revisados por la institución financiadora, los comités de ética y otros oficiales correspondientes a esta investigación.

Usted tiene el derecho de retirar su permiso a los investigadores para utilizar o compartir su información individual. Si desea hacerlo, debe informarlo por escrito contactando al equipo de investigación.

Usted tiene el derecho de no firmar este formulario. Si decide no firmar, no puede participar en este estudio de investigación.

Usted tiene el derecho de conocer su información recopilada durante este estudio. Si desea hacerlo, debe informarlo por escrito contactando al equipo de investigación.

PUBLICACIÓN DE RESULTADOS O USO PARA PROPÓSITOS PEDAGÓGICOS

Los resultados del total de información reunida en este estudio pueden ser publicados en libros o revistas médicas o de salud pública, también pueden ser usados para propósitos pedagógicos. Ni su nombre ni ningún otro identificador se usará en ninguna publicación ni en materiales pedagógicos.

RECHAZO O RETIRO DE SU PARTICIPACIÓN

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. El rechazo a participar o el retirarse del estudio en cualquier momento no involucrarán ninguna penalización ni pérdida de los beneficios a los que tiene derecho, ni afectará su presente o futura atención médica.

**Parte II: Certificado de Consentimiento**

Comprendo mi participación en este estudio. Me han explicado los riesgos y beneficios de participar en un lenguaje claro y sencillo. Todas mis preguntas fueron contestadas. Me permitieron contar con tiempo suficiente para tomar la decisión de participar y me entregaron una copia de este formulario de consentimiento informado. Acepto voluntariamente participar en esta investigación

Firma

Fecha***Investigador***

He presenciado la lectura del consentimiento informado al potencial participante. El mismo ha tenido la oportunidad aclarar sus dudas con respecto al documento. Yo confirmo que ha firmado el consentimiento libremente.

Nombre del investigador

Firma

Fecha

Anexo 4. Transporte de muestras al Laboratorio de Biología Molecular ubicado en el centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

**PROTOCOLO PARA TRANSPORTE DE MUESTRAS DE CEPILLADO
ENDOCERVICAL**

Materiales y reactivos:

- Cooler hermético.
- Geles refrigerantes.
- Tubos de ensayo de 10 ml estériles.
- Tapas para tubos de ensayo estériles.
- Cepillos para muestras endocervicales
- Suero fisiológico estéril.

Procedimiento:

- Pipetear 2000 ul de suero fisiológico estéril en los tubos de ensayo
- Rotular cada tubo de ensayo con un código único de la paciente.
- Colocar el cepillo endocervical dentro del tubo una vez tomada la muestra.
- Tapar herméticamente el tubo
- Homogenizar la muestra en el suero fisiológico.
- Colocar los tubos en un segundo recipiente siguiendo las normas internacionales del Sistema del triple envase
- Colocar los tubos con las muestras en el cooler hermético, el cual se encuentra a temperatura de 2 – 8°C con la ayuda de los geles refrigerantes.

- Se lleva inmediatamente al Laboratorio de Biología Molecular para realizar la extracción del material genético.

FUENTE: Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas, 2013.

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

Anexo 5. Control interno de DNA

1. Realizar la extracción de DNA
2. Cuantificar el DNA mediante espectrofotometría en el NanoDrop 2000.
3. Mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, pipetear las muestras de DNA con diferentes cantidades, dependiendo de la concentración dada en espectrofotometría.
4. Realizar la corrida de DNA a 80 voltios, 400 mAh por 60 minutos.
5. Visualizar el DNA en el fotodocumentador.
6. La visualización de una sola banda de DNA es indicativa de buena calidad de material genético.

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

Anexo 6. PCR del control positivo de VPH obtenido en el centro de Salud N° 3.

1. Mediante consentimiento informado, solicitar a una paciente con diagnóstico de CCU una muestra de cepillado endocervical, el cual se usará como control positivo.
2. Seguir las normas de bioseguridad.
3. Realizar la extracción de DNA.
4. Cuantificar el DNA extraído.
5. Efectuar el control interno del DNA
6. Realizar la PCR de la muestra, usando el protocolo de referencia.
7. Usar primers MY11/09 para amplificar la región L1 de VPH
8. Analizar los productos de PCR
9. Visualizar los productos en el fotodocumentador
10. Observar el control positivo el cual tiene un amplicon de 450 pb.

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

Anexo 7. Protocolo de referencia para estandarización de la PCR

1. Pruebas de PCR (PCR de punto final o convencional para determinar VPH)

a. Primers MY11/09

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
H2O	Ajustar al volumen final de 25ul.		
Buffer de PCR	10x	1x	2.5ul
MgCl₂	50mM	1.5mM	0.75ul
DNTPs	10mM	0.2mM	0.5ul
PF/MY11	10uM	0.2mM	0.5ul
PR/MY09	10uM	0.2mM	0.5ul
Taq	5U/ul	0.4u	0.08ul
DNA		100ng/200ng	
	Volumen final		25ul

b. Ciclaje de PCR para determinar VPH

Ciclaje de PCR de punto final		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	2 min	1x
94°C	1 min	
50°C	1 min	40x
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
4°C	∞	1x

FUENTE: INSPI, 2017.

Anexo 8. Protocolo estandarizado para la PCR en muestras de cepillado endo-cervical.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
H2O	Ajustar al volumen final de 25ul.		
Buffer de PCR	10x	1x	2.5 ul
MgCl₂	10 mM	1.5 mM	3,8 ul
dNTPs	10 mM	0.4 mM	1 ul
PF/MY11	10 uM	0.4 mM	1 ul
PR/MY09	10 uM	0.4 mM	1 ul
Taq	5 U/ul	2,5 U	0,5 ul
DNA		30 ng	
	Volumen final		25ul

Ciclaje de PCR de punto final		
Temperatura	Tiempo	Repeticiones
94°C	5 min	1x
94°C	1 min	40x
40°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
4°C	∞	1x

Fuente: Hoja de registro de datos

Elaborado por: Joffre Andrés Toledo Jaramillo.

Anexo 9. Protocolo de extracción de DNA (Invitrogen PureLink DNA Kits).

1. Colocar en un tubo eppendorf 200 μ l de muestra
2. Agregue 20 μ l de Proteinasa K
3. Agregue 20 μ l de RNasa A mezcle bien por breves
4. Agregue 200 μ l de tampón de lisis / unión genómica PureLink TM y mezcle bien en vórtex para obtener una solución homogénea.
5. Incube el tubo a 55 ° C con vórtex ocasional hasta que se complete la lisis
6. Agregue 200 μ l de etanol al 96-100% al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.
7. Retire una columna de centrifugación PureLink TM en un tubo colector.
8. Cargue el lisado (~ 640 μ l) con Lysis / Binding Buffer y etanol
9. Centrifugue la columna a 10.000 \times g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Deseche el tubo colector y coloque la columna giratoria en un nuevo tubo.
11. Lavar la columna con 500 μ l de tampón de lavado 1 preparado con etanol.
12. Centrifugue la columna a 10,000 \times g por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el tubo de recolección y coloque la columna en un nuevo tubo de recolección.
13. Lavar la columna con 500 μ l de tampón de lavado 2 preparado con etanol.
14. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente. Deseche el tubo de recolección.
15. Coloque la columna giratoria en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
16. Eluir el ADN con 25-200 μ l de tampón de elución genómica PureLink TM.
17. Incube la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto.
18. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.

19. El tubo contiene ADN purificado.

20. Almacenar el ADN a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a corto plazo o $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para almacenamiento a largo plazo.

FUENTE: www.thermofisher.com

Anexo 10. PCR del DNA obtenido para detección de VPH.

Material:

- Micropipetas
- Puntas para PCR
- Autoclave
- Tubos para PCR
- Gradilla para tubos de PCR
- Termociclador
- Reactivos para PCR

Procedimiento:

1. Encender los rayos UV de la Cabina de flujo laminar con el fin de esterilizar el interior de esta, durante 10 – 15 min.
2. Todos los materiales deben estar estériles (autoclave) y limpios.
3. Preparar los tubos que habrá de utilizar para la PCR en una gradilla.
4. Realizar los cálculos de para preparar las reacciones necesarias.
5. Descongelar todos los reactivos que se va a utilizar dentro de la cabina para que no exista contaminación.
6. Etiquetar los tubos de PCR y el tubo para realizar el Mix de PCR.
7. Pipetear 2,5 ul de Buffer, 3,8 ul de MgCl, 1 ul de dNTPs, 1 ul de Primer Forward, y 1 ul de Primer Reverse en el tubo para Mix de PCR.
8. Colocar cantidades requeridas de DNA en los tubos de PCR hasta obtener una concentración de 30 ng.

9. Pipetear cantidad requerida de Agua Ultra Pura, con el fin de obtener solo 25 ul de Reacción.
10. Sacar del congelador la Taq polimerasa y regresarla inmediatamente después de haber colocado 0,5 ul en el Mix de PCR.
11. Mezclar el Mix de PCR hasta obtener una solución homogénea.
12. Pipetear 9.8 ul del Mix de PCR en cada uno de los tubos.
13. Llevar inmediatamente al termociclador, previamente programado con las condiciones necesarias e incubar durante 2 horas 45 minutos.
14. Al terminar su PCR, analizar su producto mediante electroforesis en gel de agarosa.

FUENTE: Conogasi, 2017

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

Anexo 11. Protocolo para preparación de TBE 10X y 1X.**TBE 10X:**

1. Disuelva (use un agitador magnético) 108 g de Tris y 55 g de ácido bórico en 800 ml de agua destilada (comience a agitar directamente después de agregar el agitador magnético a la mezcla de ácido tris / ácido bórico)
2. Agregue 40 ml de 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) (alternativamente use 9.3 g de Na₂EDTA)
3. Ajustar el volumen a 1 litro
4. Almacenar a temperatura ambiente.

(Nota: 10x TBE puede tardar un tiempo en disolverse, incluso con agitación rápida)

TBE 1X:

1. Para electroforesis en gel de agarosa el TBE se puede utilizar en una concentración de 1x.
2. Diluir 100 ml de la solución madre de TBE 10x en 900 ml agua desionizada o destilada.

FUENTE: biotech industry, 2013

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

Anexo 12. Protocolo de electroforesis en geles de agarosa.

Introducción:

La electroforesis es un método de separación de biomoléculas como el DNA o RNA de acuerdo con su tamaño, permitiendo además su aislamiento cortando la zona de interés. La electroforesis en ácidos nucleicos es muy versátil, porque permite una observación directa de cada fragmento separado directamente en el gel, ya que, su tinción mediante un compuesto llamado bromuro de etidio o Syber Safe, hace visible al DNA o RNA, mediante la emisión de luz ultravioleta. Cuando una corriente eléctrica se aplica sobre el gel de agarosa el DNA tiene una carga negativa y migra hacia el ánodo (polo positivo).

Materiales:

Tampones y soluciones:

- Agarosa
- TBE (Tris-buffer borato-EDTA) (10 X y 1X)
- Buffer de carga.
- SyberSafe (10 mg/ml)

Equipos y consumibles:

- Microondas
- Pipetas desechables
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Frascos de vidrio de 500 ml o matraces Erlenmeyer
- Guantes

- Puntas de pipeta de cinta (10, 100, 1000 μ l)
- Fotodocumentador.

MÉTODO:

1. Sellar los bordes de una placa de cristal limpio y seco con una cinta para formar un molde. Colocar el molde sobre una sección horizontal de la banqueta.
2. Preparar una cantidad suficiente de TBE 1X (1000 ml) para llenar la cámara de electroforesis.
3. Pesar la cantidad apropiada de agarosa en polvo (por ejemplo, 1 g equivalente a agarosa al 1 %) en un lugar limpio.
4. Añadir 100 ml de temperatura ambiente TBE 1X. El buffer debe ocupar el máximo.
5. Calentar la mezcla en el microondas (al principio a la máxima potencia hasta que aparezcan burbujas, reducir la potencia media a más tarde para evitar más de ebullición).
6. Sacar con un guante de horno y agitar con cuidado el frasco o matraz de vez en cuando para asegurarse de que cualquier desfunde los granos de agarosa pegados en las paredes ingresan a la solución. Verificar para la completa disolución de la agarosa, hasta que se logre una solución transparente.
7. Dejar enfriar un poco antes de colocar 5 μ l de SybrSafe en el gel, y homogenizar.
8. Elegir el peine adecuado para formar los pocillos en el gel.
9. Verter el gel en la cámara de electroforesis y esperar hasta que se solidifique.

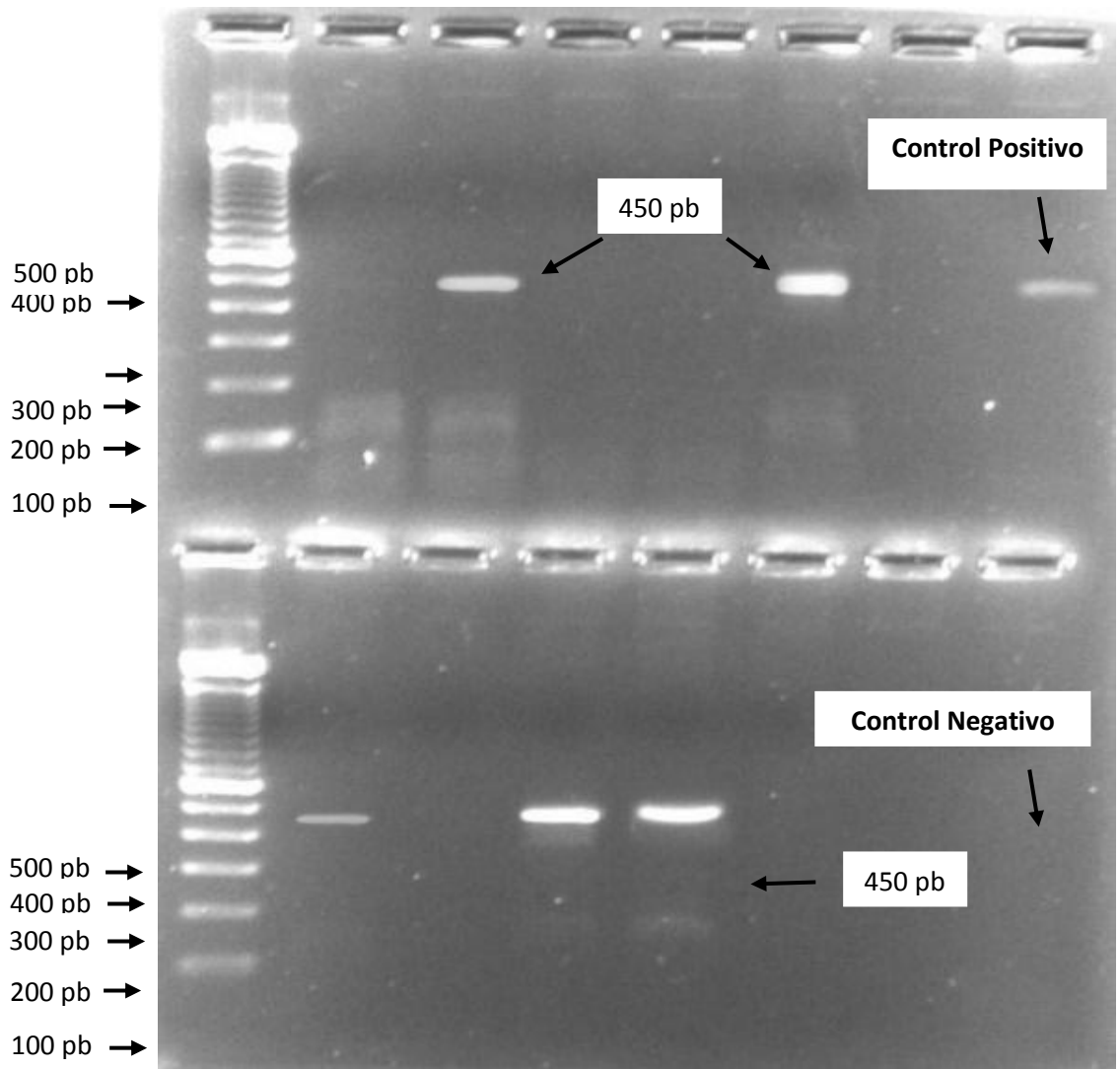
Sugerencia: El gel debe estar entre 3 mm y 5 mm de espesor. Compruebe que no hay burbujas de aire bajo o entre los dientes del peine. Burbujas de aire en el gel fundido puede ser quitado fácilmente por metiendo con una punta o llevando las burbujas hacia una esquina del gel, viendo de que no interfiera en la corrida.

10. Retirar los peines con cuidado una vez que el gel se haya solidificado completamente.
11. Colocar la bandeja que contiene el gel en el tanque de electroforesis, agregue suficiente tampón de electroforesis (TBE 1X) para cubrir el gel hasta una profundidad de 1 mm.
12. Pipetear 2 μ l de buffer de carga para cada una de las muestras en el papel de Parafilm.
13. Mezclar las muestras y buffer de carga hasta un volumen de 10 μ l. Por ejemplo, 8 μ l de muestra de DNA + 2 μ l de buffer de carga. Los productos de PCR a partir de muestras clínicas podrían requerir de un mayor volumen de carga.
14. Cargar la muestra lentamente la mezcla en los pocillos del gel sumergido mediante una micropipeta.
15. Cerrar la tapa del tanque de gel y conectar a la fuente de poder para que el ADN migre hacia el ánodo positivo.
16. Configurar la fuente de poder a 80 voltios, 400 mAh y dejar correr durante 60 min (1h).
17. Al final de la corrida apagar la corriente eléctrica y quite las flexiones y la tapa del tanque.
18. Examinar el gel en el fotodocumentador y fotografíe bajo luz UV.

FUENTE: Conagasi, 2017

ELABORADO POR: Joffre Andrés Toledo	REVISADO Y APROBADO POR: Dr. Franklin Román C.
---	--

**Anexo 13. Visualización de los productos de PCR en el fotodocumentador
ENDURO™ GDS Gel Documentation System – Probiotek**



Anexo 14. Hoja de registro de resultados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE SALUD HUMANA LABORATORIO CLÍNICO

CÓDIGO	EDAD	PRESENCIA DE VPH	OBSERVACIONES
1	39	NO	
2	26	SI	
3	28	SI	
4	28	SI	
5	45	SI	
6	45	SI	
7	24	NO	
8	27	SI	
9	26	SI	
10	23	SI	
11	38	NO	
12	25	SI	
13	54	NO	
14	28	NO	
15	48	SI	
16	21	SI	
17	35	NO	
18	28	SI	
19	41	SI	
20	43	NO	
21	61	SI	
22	37	NO	
23	35	NO	
24	20	NO	
25	27	NO	
26	49	SI	
27	20	SI	
28	53	NO	
29	28	NO	
30	25	SI	
31	37	NO	
32	45	NO	
33	18	SI	
CÓDIGO	EDAD	PRESENCIA DE VPH	OBSERVACIONES

34	27	NO	
35	24	SI	
36	20	SI	
37	19	SI	
38	40	NO	
39	33	NO	
40	22	SI	
41	41	NO	
42	29	SI	
43	30	NO	
44	46	NO	
45	24	NO	
46	40	SI	
47	25	NO	
48	35	SI	
49	35	NO	
50	29	SI	
51	45	NO	
52	37	SI	
53	37	NO	
54	38	NO	
55	25	SI	
56	42	NO	
57	30	NO	
58	51	NO	
59	52	NO	
60	39	NO	
61	40	NO	
62	32	SI	
63	21	SI	
64	41	NO	
65	25	SI	
66	22	SI	
67	40	NO	
68	22	SI	
69	18	SI	
70	38	NO	
71	24	NO	
72	40	NO	
73	36	NO	
74	18	NO	

Anexo 16. Solicitud y hojas de registro de asistencia para socialización de resultados.

Loja, 04 de Diciembre de 2018

Dra. Sandra Freire Cuesta.
GESTORA ACADEMICA DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO.
 Ciudad.-

Ref.: Socialización de resultados de Tesis de Joffre Toledo J.

De mi consideración:

Alicia Villavicencio O. docente de la carrera de laboratorio clínico y Joffre Andrés Toledo Jaramillo, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico, con un cordial saludo nos dirigimos a usted para solicitar:

- Se autorice la participación de estudiantes de 3ro a 5to ciclo y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico en la socialización de resultados de la tesis "Incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N° 3" de autoría de Joffre Andrés Toledo Jaramillo, egresado de la carrera de Laboratorio Clínico: evento planificado para desarrollarse, salvando su mejor criterio, el día martes 11 de Diciembre, a partir de las 15:00.
- Se autorice el uso del Aula Magna Edmundo Granda Ugalde para el desarrollo del evento antes citado

Por la atención que sepa brindar a la presente le anticipo mis agradecimientos.

De Ud. muy atentamente,



 Lcda. Alicia Villavicencio O.
 Docente y directora de Tesis



 Sr. Joffre Toledo J.
 Tesista

RECIBIDO
 POR: Ana Aquino
 FECHA: 04-12-2018
 15 h



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

TEMA: Socialización de resultados sobre incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Cristina Cárdenas	III "A"	0705855583	
Jessico Hidalgo	III "A"	0706967494	
Johanna Guaman	III "A"	1104540958	
Priscila García	III "A"	0705653400	
Miller Ludeña	III "A"	115049671	
Yerald Ludeña	III "A"	1150010906	
Dora Ruilova	III "A"	1150021507	
Nayley Nicol Merino C	III "A"	1150761045	
Ylady Elizabeth Cando C.	III "A"	1150017661	
Olivera Ortiz Rofrío	III "A"	1106067372	
Keely Poma.	III "A"	1900886076	
Jordan Saínchez	III "A"	2105833238	
Jennifer Pérez Quezada	III "A"	1950003499	
Karla Elizabeth Gago	III "A"	1150201091	
Helen Yamilex Armijos	III "A"	1900878602	



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

TEMA: Socialización de resultados sobre incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Melissa Carolina Franco D.	IV	1105648263	<i>Melissa</i>
Galo Israel Rojas G.	IV	1105515888	<i>Galo</i>
Yelena Neira Correa	IV	1106767618	<i>Yelena</i>
María Gabriela Pérez	IV	1150694204	<i>María</i>
Cecibel María Espinoza C.	IV	1150007605	<i>Cecibel</i>
Cecilia María Jiménez J.	IV	1105276156	<i>Cecilia</i>
Leonela Melissa Saez M.	IV "B"	1105504854	<i>Leonela</i>
Betsaida Covazin Vera	IV "B"	1600475410	<i>Betsaida</i>
Daniela Elizabeth Ruiz	IV "B"	1105097669	<i>Daniela</i>
Adriana Elizabeth Sánchez J.	IV "B"	110501125-6	<i>Adriana</i>
Jasmina Ochoa Sánchez	IV "B"	190069763-0	<i>Jasmina</i>
Oscair López	III "A"	1150231924	<i>Oscair</i>
Keily Jiménez	III "A"	1900844174	<i>Keily</i>
Dámaris Cuchimbo.	III "A"	1900635838	<i>Dámaris</i>
Stephan Mellana Parra	III "A"	1750463023	<i>Stephan</i>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

TEMA: Socialización de resultados sobre incidencia del virus del papiloma humano en usuarias del servicio de ginecología del centro de salud N°3 de la ciudad de Loja.

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
C. Lilibeth Macas J.	IV "A"	1900873620	
Jennifer Riera	IV "A"	1105699753	
María E. Arredondo Capa	IV "A"	1105456543	
Armando García	IV A	1150204748	
Edita Hernández	IV "A"	1150051447	
Daniel Vera	IV "A"	1105366254	
Jhoselyn Belduma	IV "A"	1900746486	
Jessenia Muñoz	IV "A"	0922866454	
Gladys Guaman	IV "A"	1105130551	
Laura Gallegos Songo	IV "A"	1105815268	
Cristian Jumbo	IV "A"	1104136344	
Patricio Conday	IV "A"	113024800-6	
Anni C. Narváez G.	IV "A"	1150171682	
Ana Janelz Castillo	III "A"	1105204489	
Amy Gisella Guaman	III "A"	1105881198	

Anexo 17.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

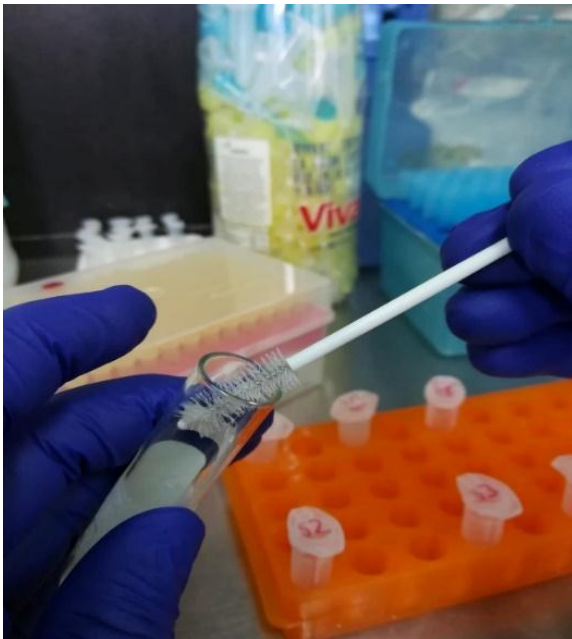
FACULTAD DE SALUD HUMANA
LABORATORIO CLÍNICO

Socialización de resultados



Descripción: Socialización de resultados en el Aula Magna Dr. Edmundo Granda U. de la Facultad de la Salud Humana, el 11 de diciembre de 2018. Asisten estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

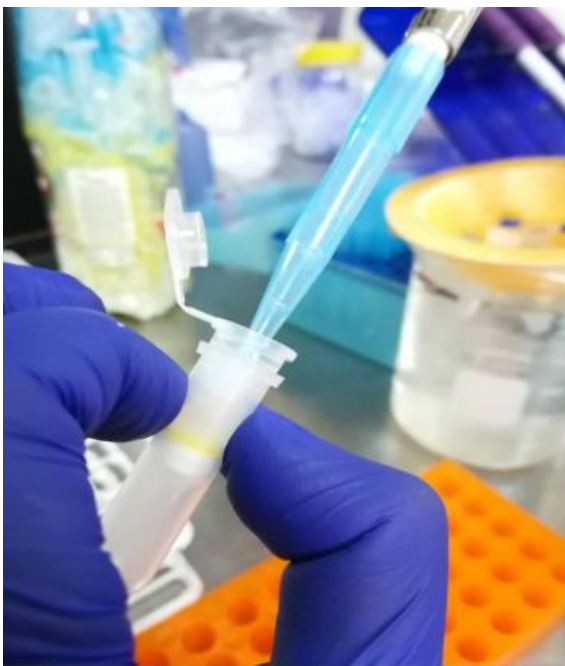
Anexo 18. Evidencia fotográfica



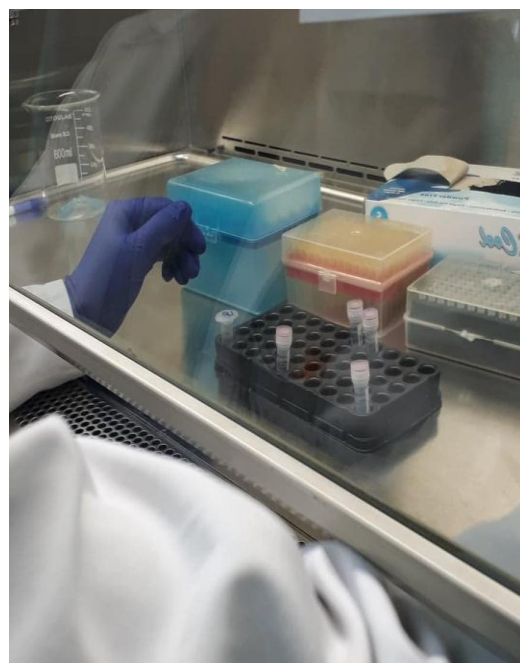
Descripción: Muestra de cepillado endocervical



Descripción: Extracción de DNA



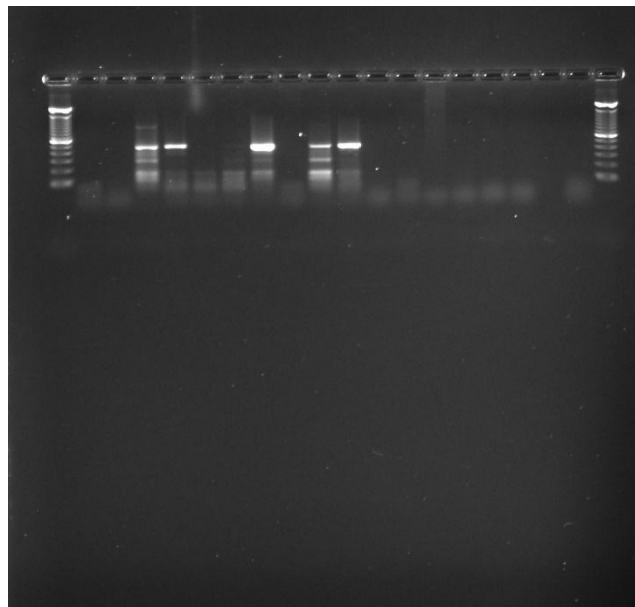
Descripción: Extracción de DNA



Descripción: Preparación de primers



Descripción: Preparación de la PCR



Descripción: Visualización de productos de la PCR

Anexo 19. Certificación de traducción

Sr. Lic. MSc. Raúl Hernán García García
**DOCENTE DE INGLES DEL COLEGIO DE BACHILLERATO "MANUELA
SAENZ"**

CERTIFICA:

Que he realizado la traducción de español a Ingles del artículo científico y resumen derivado de la Tesis **"INCIDENCIA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN USUARIAS DEL SERVICIO DE GINECOLOGIA DEL CENTRO DE SALUD Nº 3 DE LA CIUDAD DE LOJA"**.

De la autoría del Sr. Joffre Andres Toledo Jaramillo, portador de la cedula de identidad número 1104837107, egresado de la carrera de Laboratorio clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, la misma que se encuentra bajo la dirección de la Lcda. Alicia Silvana Villavicencio Obando.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando al interesado hacer uso del presente en lo que se estime conveniente.

Zumba, 26 de noviembre del 2018.

ATENTAMENTE:



Sr. Lic. MSc. Raúl Hernán García García