



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**División de Estudios de Postgrado
e Investigación**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE
LOS TRABAJADORES DEL ESTADO**

**“PREVALENCIA DE LOS VIRUS DE PAPILOMA DE ALTO RIESGO
(16 Y 18) POR MEDIO DE PCR EN PACIENTES CON NEOPLASIA
INTRAEPITELIAL DE LA CLINICA DE COLPOSCOPIA H.R.LIC.
ADOLFO LOPEZ MATEOS ISSSTE”**

Trabajo de Investigación que presenta:

DRA. BRENDA VALERIA GABILONDO ACEVEDO

Para obtener el Diploma de la Especialidad en

GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

Asesor de Tesis:

DR. OSCAR AUGUSTO TREJO SOLORIZANO

No. De Registro de Protocolo: 396.2012

2014

MÉXICO., D.F.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. FÉLIX OCTAVIO MARTÍNEZ ALCALÁ
COORD. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DR. GUILBALDO PATIÑO CARRANZA
JEFE DE ENSEÑANZA

DRA. MARTHA EUNICE RODRÍGUEZ ARELLANO
JEFE DE INVESTIGACIÓN

DR. OSCAR AUGUSTO TREJO SOLORZANO
PROFESOR TITULAR

DR. OSCAR AUGUSTO TREJO SOLORZANO
ASESOR DE TESIS

El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere,
sino querer siempre lo que se hace.

“León Tolstói”

He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña,
sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada

“Gabriel García Márquez”

DEDICATORIA

A todos quienes han formado parte de mi vida, los que han permanecido con el paso de los años, aquellos que se han quedado en el camino, a los que vendrán y que con ilusión espero.

A mi esposo Francisco por ser pieza clave, por estar conmigo cada vez que estoy por caer, por impedir esa caída y amarme como nadie jamás lo ha hecho, eres lo mejor que me ha pasado en la vida, gracias por tanta paciencia, comprensión y apoyo. Te amo

A mis padres Gema y Arturo, porque gracias a su amor, sacrificios, apoyo y confianza he llegado a realizar dos de mis más grandes metas en la vida. La culminación de mi especialidad y el hacerlos sentirse orgullosos de esta persona que tanto los ama y admira. Son mi ejemplo a seguir de amor y vida.

A mis hermanas; Ana Patricia mi corazón está plenamente agradecido por haber sido bendecido por tu presencia. Tu humildad, amor, fidelidad y existencia tienen un valor inmenso en mi vida, bendito el día en que Dios decidió que tú fueras mi hermana.; y a mi angelito María Fernanda por estar siempre presente guiando mis pasos, porque para sentirte cerca únicamente hay que tener la mente y el corazón dispuestos.

A mis abuelos Mari, Roberto[†] y Carmen por ser mis segundas madres y padre, el mayor tesoro de la familia y fundadores de un legado de amor, porque con ello me han enseñado el camino de la vida y ejemplo para salir adelante.

A todos mis tíos y primos con especial dedicatoria a Tere, Paquito, Carlota, Jaime, Lorena, Maricarmen, Adriana, Lalo, Karla, Camina, porque sin duda la familia proporciona unos valores que quedan para toda la vida. Una familia unida y llena de amor es un lujo difícil de conseguir.

A todos mis amigos por su cariño, paciencia, apoyo y estar siempre que los he necesitado.

Porque jamás encontraré la forma de agradecer los buenos y malos momentos, hago este triunfo compartido, sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo como el desarrollo de una tesis es inevitable que te asalte un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que has hecho. Sin embargo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Agradezco de manera especial y sincera al Dr. Oscar Augusto Trejo Solórzano al aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo así como capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador y médico especialista.

A mis profesores Dra. María del Carmen García Martínez y Dr. José Adrián Tolentino López por su gran dedicación hacia mi enseñanza y crecimiento profesional.

A mis compañeros y amigos por compartir esta inolvidable experiencia, especialmente a Itzel, Joel y Tania, por el apoyo y cariño incondicional que siempre nos ha caracterizado. Gaby gracias por ser más que una amiga, por porque a pesar de la distancia y adversidades siempre estaremos juntas.

A todos los médicos especialistas que colaboraron en mi formación mencionando con gran cariño al Dr. Vicente Rodríguez, Dr. Carlos Hernández, Dra. Silvia Castro, Dr. Juan Pablo Barba, Dr. Raymundo Pérez, Dr. Camal Ugarte, Dra. Patricia García y Dra. Jeannelle Gómez.

A quienes me ayudaron para lograr una correcta recopilación de datos, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y amplio conocimiento Dr. Fernando E. de la Torre Rendón, Dra. Esperanza Tamariz Herrera †, Citotecnóloga Edna Díaz Ortiz y Lic. Denise Berenice Aldama Silva.

Y por supuesto el agradecimiento más profundo y sentido a mi familia y esposo. Sin su existencia mi vida y felicidad no sería completa, gracias por siempre estar a mi lado, apoyarme y hacerme quien soy ahora.

Te agradezco Dios por la vida que mediste, por la familia que me permites compartir, por mis amigos que son como mi familia, por toda la felicidad y hasta los malos momentos porque con ello me has enseñado a vivir y compartir con quienes más amo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCCION.....	10
OBJETIVOS	14
HIPÓTESIS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	21
TABLAS Y GRÁFICAS.....	22
CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	36
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

RESUMEN

Antecedentes. El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. Sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se puede detectar y tratar oportunamente, reduciendo el impacto de esta enfermedad. Para el cribado del cáncer cervical se ha utilizado tradicionalmente la citología y actualmente la prueba para detección de biología molecular para determinar el ADN de los virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) en mujeres a partir de los 35 años de edad.

Objetivo: Determinar la prevalencia de infección de virus del papiloma de alto riesgo (VPH-AR) genotipos 16 y 18 por medio de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) a tiempo real y relacionar sus resultados con los de la citología tradicional, en población de mujeres de entre 35 y 64 años de edad.

Material y métodos: Investigación experimental descriptiva, longitudinal, abierta, Se incluyeron 1237 pacientes del servicio de colposcopia a las cuales se les realizó de manera conjunta una citología cervical convencional y una toma para determinación del ADN por medio de PCR en tiempo real de los genotipos 16 y 18 con el sistema COBAS 4800 de Roche. Se realizó una base de datos en Excel y análisis posterior de resultados positivos a VPH-AR y relación con citología cervical convencional.

Resultados: Con una muestra total 148 pacientes positivas a VPH-AR 16 y 18, siendo 111 de 35 a 64 años. Se calcularon las variables edad y los resultados de la citología cervical y PCR. La distribución por grupos de edades refleja que entre 45 a 49 años se encontraron 29 pacientes con frecuencia máxima de pruebas positivas (26.1%), seguido de 21 pacientes entre 50 a 54 años (18.9%). En la citología cervical convencional se reporta negativo en 89 pacientes (80.1%), NIC 1, NIC 2 en 14 pacientes (12.6%). En 77 muestras se encontraron resultados positivo al genotipo 16 (69.4%), 28 fueron positivas al genotipo 18 (25.2%) y 6 fueron positivas a ambos genotipo 16 y 18 (5.4%).

Conclusiones: La importancia de utilizar una prueba de detección de ADN de VPH-AR permite identificar separadamente los genotipos 16 y 18, con el propósito de establecer estrategias que permitan un seguimiento selectivo de las pacientes infectadas por estos genotipos, que son mujeres con posibilidades de generar una lesión intraepitelial grave así como una lesión invasora.

Palabras claves: Virus papiloma humano, Reacción en cadena de la polimerasa, Cáncer cervicouterino, citología cervical, genotipo

SUMMARY

Background. Cervical cancer is the second leading cause of death from malignancy in women. However, with cytology and histopathology can be detected and treated promptly, reducing the impact of this disease. For cervical cancer screening has been used traditionally and currently cytology test for detection of molecular biology to determine the DNA of human papillomavirus high risk (HR-HPV) in women aged 35 years old.

Objective: To determine the prevalence of human papillomavirus infection of high risk (HR-HPV) genotypes 16 and 18 by means of the technique of polymerase chain reaction (PCR) in real time and relate their results with those of traditional cytology in population of women between 35 and 64 years old.

Material and methods: descriptive, longitudinal, open experimental Research, 1237 patients from the colposcopy which were jointly performed a conventional cervical cytology and a socket for DNA determination by real-time PCR genotypes were included 16 and 18 with the Roche COBAS 4800 system. A database in Excel and subsequent analysis of HPV - positive results regarding AR and conventional cervical cytology was performed.

Results: With a total sample of 148 patients positive HR-HPV 16 and 18, being 111 35 to 64 years. The following variables were calculated, resulting cervical cytology and PCR. The distribution by age groups shows that between 45 to 49 years 29 patients were found with a high frequency of positive tests (26.1 %) , followed by 21 patients aged 50-54 years (18.9 %). In conventional negative cervical cytology reported in 89 patients (80.1 %) , CIN 1, CIN 2 in 14 patients (12.6 %) , 77 positive for genotype 16 (69.4 %) in 45-49 years , 28 positive for genotype 18 (25.2 %) at 35-39 / 50-54 years and 6 positive for genotypes 16 and 18 (5.4 %) in 45-49 years . From a total of 8 positive cytology (7.8 %) (Graf.1-5.)

Conclusions: The importance of using a test for HR-HPV DNA can separately identify genotypes 16 and 18 in order to devise strategies for selective monitoring of patients infected with these genotypes are women with the potential for injury severe intraepithelial lesion and invasive.

Keywords: Human papillomavirus high risk, chain reaction polymerase, Cervical Cancer, cervical cytology, genotype.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer. Sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar tempranamente y tratar oportunamente, reduciendo el impacto de esta enfermedad.¹

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300,000 muertes al año.² El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo cerca de 500 000 casos nuevos se presentan cada año. Tan solo en el año 2002 se presentaron 493 243 y de estos, 273 505 fueron decesos. En México, en el año 2002, se presentaron 12 512 nuevos casos de cáncer cervicouterino, de los cuales 5 777, el 46% de los casos, fueron decesos.² Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% de otros cánceres.¹⁻² La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica cáncer cervicouterino.³⁻⁴

Casi todos (99,8%) los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de un virus DNA tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH).⁵⁻⁶

El virus de papiloma humano (VPH) pertenece a la familia de Papoviridae. Ellos tienen una cápside de 72 capsómeros contenidos en el genoma viral. Los capsómeros están formados por 2 estructuras proteicas: proteínas tardías 57 kD, L I (L de late tardío), el cual cuenta para el 80% de la partícula viral, y el menor 43-53 kD de la proteína cápside L2. Los VPH son relativamente estables y porque no tienen cubierta, permanecen contagiosos (contaminantes) en un ambiente húmedo por meses. En general, causan infecciones epiteliales locales.⁷⁻⁸

Clasificación de los papilomavirus

Basada en las diferentes secuencias del DNA dentro del la región del código de las proteínas tempranas E6, E7 y de la proteína tardía L1. Genotipos tienen < del 90% de la secuencia homóloga del DNA en esas regiones: alrededor de 130 han sido descritos, a la fecha.⁹ Subtipos tienen homología del 90–98% dentro de un genotipo. Las variantes tienen homología del > 98% dentro de un subtipo.^{8,9}

El origen del cáncer cervical ahora ha sido probado más allá de cualquier duda razonable. Estudios recientes han demostrado que el DNA del VPH, se puede encontrar en el 99.7% de todos los carcinomas cervicales, siendo los más frecuentes los tipos de VPH 16, 18, 45 y 31. Basados en esas observaciones, los VPH anogenitales se ha dividido en dos grupos: el primero asociado con

riesgo alto para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Los VPH de alto riesgo (HR) (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82), y el segundo grupo con potencial bajo carcinógeno (6, 11, 40, 43, 44, 54, 61, 72 y 81).¹⁰⁻¹¹ Ahora se ha probado más allá de una duda razonable que la infección con VPH de alto riesgo es un prerrequisito necesario para el desarrollo de cáncer cervical, y la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha reconocido que los VPH 16 y 18 son agentes carcinógenos para los humanos.¹²⁻¹³⁻¹

El riesgo de contraer un VPH genital está influenciado por la actividad sexual, por lo que el CaCu sigue un patrón típico de enfermedades transmitidas sexualmente.¹²

- 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 otras enfermedades transmitidas sexualmente.
 - Verrugas genitales, test de Papanicolaou con resultados anormales.
 - Pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene.
 - Edad. La infección es más común en mujeres jóvenes sexualmente activas
- El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer
- Persistencia viral. Común entre los tipos virales de alto riesgo y factor determinante en el desarrollo a cáncer. La persistencia puede inducir cambios genéticos secundarios dado que las proteínas virales interfieren con los puntos de control del ciclo celular e inducen inmortalización de los queratinocitos.
 - Uso prolongado de anticonceptivos orales. La región larga de control, LCR por las siglas en inglés, en el genoma viral, contiene elementos de respuesta a glucocorticoides, inducibles por hormonas esteroidales como la progesterona (componente activo de los anticonceptivos orales) y la dexametasona. Estudios han reportado el uso de anticonceptivos orales y la alta positividad al DNA viral
 - Coinfección con otros virus, como el del herpes simple (HSV) tipo 2, citomegalovirus (CMV), herpes virus humano tipos 6 y 7 (HHV-6), detectados todos en el cérvix.
 - Carga viral. Correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad. El VPH 16 puede alcanzar una carga viral más alta que otros tipos virales.
 - Predisposición genética. Representa el 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor.^{9,12}

La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo en mujeres va de un 2% a un 44%, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos parece ser más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos. La mayoría de las lesiones leves o moderadas revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes.^{11,12}

Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo, la mayoría son transitorias y solo cerca del 25% desarrollan una lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL por las siglas en inglés bajo el sistema Bethesda de clasificación de células displásicas cervicales). Después, solo del 20 a 40% de estas LSIL progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL). Esto significa que aquellas mujeres que en alguna ocasión adquieren un VPH, solo el 5 o 10% de ellas desarrollarán una HSIL, mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia alguna del tipo viral adquirido después de 12 a 36 meses.¹² Sin embargo, en aquellos con una deficiencia inmune, heredada o inducida farmacológicamente, hay una fuerte tendencia para que la infección persista y malignice en caso de infección con VPH de alto riesgo oncogénico. Si el virus permanece en forma latente, una mujer que parece haber tenido una regresión de su infección entre sus visitas de seguimiento estaría aún en riesgo de desarrollar alguna lesión asociada al VPH.¹³

La prueba de ADN del VPH: Esta prueba detecta alrededor de 13 tipos del virus que son los que están asociados a la presencia de cáncer cervical. La importancia de identificar en este estudio los serotipos 16 y 18 es debido al alto porcentaje de presentación para adquirir neoplasia intraepitelial, siendo estos específicos de alto riesgo.^{13,14}

Está indicada junto a la citología en el escrutinio de mujeres a partir de 35 años. Esta prueba mostró que la capacidad de identificación de la presencia de células pre cancerosas o el cáncer de cérvix fue del 94,6 por ciento en test de VPH, frente al 55,4 por ciento de la citología. Una técnica no excluye a la otra.¹⁴ En las mejores condiciones, el Papanicolaou tiene una sensibilidad (la capacidad de la prueba de detectar el total de enfermas) del 58 por ciento y una especificidad (la capacidad de detectar el total de sanas) del 96 por ciento. En cambio, la prueba de VPH tiene una sensibilidad del 95 por ciento y una especificidad del 94 por ciento. Dirigirla a las mayores de 30 años, que por lo general no tienen capacidad de eliminar las lesiones, y que presenten una infección persistente, para poder diagnosticar lesiones de alto riesgo.¹⁵

Aunque la citología cervical ha contribuido enormemente a la reducción de la morbimortalidad del cáncer cervical, su sensibilidad para detectar lesiones precursoras de cáncer es muy baja, aproximadamente del 55,4%. En comparación, la prueba de detección del ADN de los genotipos VPH-AR en muestras cervicales tiene una sensibilidad de hasta el 96,6% para detectar lesiones precancerosas aunque es menos específica que la citología.¹⁶

Sin embargo, el verdadero valor de la prueba de detección del ADN de los VPH-AR es su altísimo valor predictivo negativo cercano al 100% que permite espaciar los cribados con la seguridad de no desarrollar NIC3 en, por lo menos, 3 años y algunos autores aseguran que hasta 5 años.^{14, 16} También hay que considerar que no todos los tipos de VPH son igual de oncogénicos. Los genotipos 16 y 18 se encuentran en el 70% de lesiones LEIAG y en el 75% de los casos de cáncer cervical. Está comprobado que el riesgo de desarrollar LEIAG en las mujeres infectadas por estos genotipos es bastante mayor que en las infectadas por otros genotipos distintos.^{13,15} Recientemente se ha propuesto un seguimiento distinto de las pacientes mayores de 30 años infectadas con estos genotipos aunque la citología sea normal o células atípicas de significado incierto (ASCUS). Por lo tanto, es muy importante que las pruebas de detección del ADN de AR-VPH detecten separadamente los genotipos 16 y 18 para hacer un seguimiento exhaustivo a estas pacientes. El sistema cobas 4800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) está compuesto por el automático cobas X, el termociclador cobas Z y el software necesario para la realización de una PCR a tiempo real con primers de la región L1 del VPH. Los resultados aparecen en pantalla diferenciados en cuatro canales: genotipo 16, genotipo 18, otros VPH-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66) y beta-globina que se usa como control interno en cada muestra.^{1,13,15}

OBJETIVO GENERAL

Conocer la prevalencia de los subtipos 16 y 18 del VPH-AR en mujeres de entre 35 a 64 años en el Hospital Regional ISSSTE “Lic. Adolfo López Mateos” y su correlación con resultado de citología cervical tradicional.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar genotipos 16 y 18 del VPH con PCR a tiempo real implementando la prueba VPH-AR COBAS 4800.
2. Análisis de resultados de citología cervical con los resultados de la prueba de PCR.
3. Establecer las pacientes que tienen alto riesgo de progresar a cáncer cervicouterino.
4. Desarrollar protocolos de manejo y tratamiento en pacientes con VPH de alto riesgo.
5. Darle seguimiento a estas pacientes durante el periodo de estudio.

HIPOTESIS

- Ha: La prueba PCR muestra mayor sensibilidad ante la prueba de citología convencional
- Ho: La prueba PCR no muestra mayor sensibilidad ante la prueba de citología convencional

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio abierto, descriptivo, experimental, longitudinal, comparativo, en las siguientes etapas:

Etapa I: Recolección de datos bibliográficos, hemerográficos, vía Internet e institucionales. Redacción y análisis del proyecto de investigación.

Etapa II: Revisión y corrección del protocolo, así como su registro en el Comité Local de Investigación del ISSSTE.

Etapa III: Selección de pacientes con PCR para VPH-AR 16 y 18 con Cobas 4800 realizando una amplificación del ADN diana mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación de ácidos nucleicos en tiempo real, se realiza el extendido en laminilla y fijado de manera tradicional, el material excedente de la brocha se colocó en el vial correspondiente para su procesamiento en el laboratorio de biología molecular.

Etapa IV: Se inició el estudio de investigación seleccionando las pacientes del servicio de colposcopia: incluyendo a 1237 pacientes en el periodo comprendido de marzo 2012 a marzo 2014. Se les realizó toma de muestra de células de la zona de transformación con una brocha de polietileno desechable de manera conjunta, para un extendido de citología cervical convencional y posteriormente se colocó el resto del material en un vial para ser enviado al laboratorio de biología molecular y ser procesado con el sistema Cobas 4800 .

Etapa V: Se da seguimiento a la toma de muestras y recaban resultados durante un periodo de dos años, Se procedió a recabar mediante una base de datos generales de las pacientes; de un total de las tomas 148 muestras resultan positivas a genotipo VPH 16 y 18. Se aplican criterios de inclusión y exclusión en edades de entre 35 a 64 años, obteniendo dentro de este rango de edad 111 pacientes positivas a VPH-AR 16 y 18.

Etapa VI: Se realiza análisis de resultados de citología convencional con resultado de PCR positivo a los genotipos del Virus del papiloma Humano 16 y 18, La información obtenida se colocó en una hoja en formato Excel 2013 de recolección de datos con la Identificación de la paciente, así como los resultados del estudio de citología cervical y de PCR positivos a VPH 16 y 18.

Para comprobar la asociación entre las diversas variables y sus categorías se aplicó la prueba de t student, v de cramer, chi cuadrada, contingencia entre variables, frecuencia entre variables y correlación de gráfica 2x2 para análisis de sensibilidad y especificidad

GRUPO DE ESTUDIO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se recaban en total 1237 muestras de pacientes del servicio de colposcopia Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos ISSSTE, en quienes se realizó citología cervical convencional y una prueba de ADN por medio de PCR para detección VPH-AR.

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Pacientes de entre 35 a 64 años del servicio de colposcopia que acudan a toma de muestra para PCR, citología cervical y colposcopia en Hospital Lic. Adolfo López Mateos ISSSTE.
2. Resultados positivos a PCR para VPH-AR en el grupo muestra

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Pacientes con diagnostico de cáncer cervico uterino.
2. Pacientes menores de 35 años y mayores de 64 años.
3. Muestras con resultado no satisfactorio

CONSIDERACIONES ETICAS

El estudio se ajustará a los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki y por el Hospital Regional ISSSTE "Lic. Adolfo López Mateos" en materia de investigación clínica.

En relación al riesgo para el sujeto de estudio de acuerdo a la Ley General de Salud es Investigación sin riesgo para el sujeto de estudio.

También se ajustará a los lineamientos establecidos por la Secretaria de Salud y por el Hospital Regional ISSSTE "Licenciado Adolfo López Mateos" en materia de manejo de información del expediente clínico.

RESULTADOS

El presente análisis lleva como objetivo conocer de manera estadística la muestra de las 111 pacientes encontradas en el rango de edad entre 35 a 64 años debido a que en este rango se concentra la mayor parte de las 148 pacientes incluidas. Se utiliza chi cuadrada, v de cramer, t student, contingencia entre variables, frecuencia entre variables, correlación y gráfica 2x2

El primer acercamiento estadístico de la muestra lo encontramos al calcular la frecuencia de la de las variables Edad de la paciente, Resultados de la Citología Cervical y Resultados de PCR.

Sobre la variable Edad de la Paciente (ver Fig. 1); hallamos que las pacientes de entre 45 a 49 años; del rango de 35 a 64 años, obtuvieron la frecuencia máxima esperada con 29 pacientes que equivalen al 26.1% del total de la población, le sigue el rango de entre 50 a 54 años con 21 pacientes equivalentes al 18.9% de las 111 pacientes incluidas (Grafica. 1).

La siguiente variable necesaria para nuestro análisis es Resultados de la Citología Cervical (ver Fig. 2) en la que encontramos que los Resultados Negativo y Negativo Respuesta Inflamatoria suman 89 pacientes representando 80.1% y la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I, NIC II) suman 14 pacientes (12.6%), la Atipia de Significado Indeterminado (ASC-US) conserva a 7 pacientes (6.3%) el reporte de NIC III se encontró solamente en una paciente (0.9%) (Grafica. 2).

La última variable de analizar es Resultados PCR de la Paciente (Figura. 3) donde las pacientes con positivo 16 son 77 que equivalen al 69.4%, 28 pacientes resultaron positivo 18 (25.2%), 6 de las 111 pacientes resultaron positivo 16-18 y representan al 5.4% (Grafica. 3)

Se realizaron dos cálculos de contingencia, uno para la variable Resultados de Citología Cervical y otro para la variable Resultados PCR con la variable Edad de la paciente para saber los porcentajes y el grado de correlación entre ellas. Encontramos los siguientes datos: la relación observada entre la edad y los positivos a NIC I, NIC II Y NIC III, es positiva en el análisis ya que el rango de edad con mayor número de pacientes es el que va de 35 a 39 años con 6 pacientes (5.4%) las siguientes pacientes con resultados positivos se encuentran entre los 45 años hasta los 64 años, 8 pacientes en total, equivalentes al 7.2%. Con diagnostico citológico de NIC III lo tiene solamente una paciente en el rango de edad de 40 a 44 (Figura. 4). Las clasificaciones Negativo y Negativo Respuesta Inflamatoria contienen a la mayoría de las pacientes en la edad de los 45-49 (23 pacientes, 20.7%).

La Atipia de Significado Indeterminado presenta la mayor frecuencia con 5 pacientes en las edades 45-49; al igual que la clasificación anterior (ver Graf. 4).

La siguiente variable sometida al cálculo de contingencia es resultados de PCR (ver Fig. 5); encontrando que la clasificación Positivo VPH 16 aparece en las pacientes de entre 45 a 49 años, ya que señala que 21 pacientes de las 77 incluidas en esta clasificación, se encuentran en este rango de edad. La clasificación Positivo VPH 18 presenta la mayor frecuencia en dos grupos de pacientes; la primera en las edades de 35 a 39 años con 7 pacientes y el segundo grupo, en el rango de 50 a 54 años con 6 pacientes que equivalen al 46.4% de las 28 pacientes positivas en esta clasificación. El resultado Positivo a VPH 16 y 18 presenta una frecuencia máxima en el rango de edad de entre 45 a 49 años con 3 pacientes (50% de las 6 pacientes positivas en esta clasificación) (Graf. 5).

Para encontrar la prevalencia de las pacientes con NIC 1 y NIC2 que resultaron positivo al VPH AR (16, 18 y 16-18) realizamos una tabla de contingencia donde encontramos que de las 77 pacientes que resultaron Positivo al VPH 16; 4 (3.6%) se encuentran con un resultado positivo a NIC 1; 2 pacientes (1.8%) y 3 (2.7%) resultaron positivo a NIC 2. Por lo tanto estas 9 pacientes representan el 8.1% del 69.4% total del resultado VPH AR 16.

Sobre las pacientes con resultado positivo a VPH AR 18; encontramos que sólo 3 pacientes (2.7%); de las 28 incluidas en esta clasificación; resultaron positivo a NIC 1; es decir, casi una décima parte del total de las pacientes positivas a VPH 18 que responden a una cuarta parte (25.2%) de las 111 pacientes incluidas en el protocolo.

Se obtuvo el mismo patrón de prevalencia en las pacientes con positivo en la prueba de PCR para VPH 16-18 con un porcentaje menor al anterior ya que sólo 2 pacientes (1.8%) resultaron con NIC 1; que representan el 33.3% de las 6 pacientes positivas a VPH 16-18 (5.4%) de las 111 pacientes incluidas en el protocolo (Graf. Contingencia)

Al cálculo de las pruebas de contingencia, hallamos que la Chi-cuadrada de Pearson esperada tiene un valor de 10,27; el valor de la significancia asintónica es de ,592; los grados de libertad alcanzan 12 puntos. La razón de verosimilitud tiene un valor de 10,52 y una significancia de ,570 y comparte el mismo puntaje de grados de libertad.

El coeficiente de Phi en la contingencia de variables nominales presentó un valor de ,304 con una significancia aproximada de ,592 al igual que la V de Cramer que presenta un valor de ,215.

En el cálculo del coeficiente T de Student encontramos que al 95% de intervalo de confianza tenemos un valor superior de 1,47 (96.47%) e inferior de 1,25 (93.75%), es decir, el grado de confianza es apto para asumir la hipótesis de investigación.

Por último se analizaron gráficos de dispersión, correlación y gráfica 2x2 para establecer la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas, así mismo se aplicó la curva COR, mostrando que existe relación directa entre ambas pruebas, sin embargo siendo esta relación bastante estrecha entre los resultados positivos con citología cervical convencional y PCR para VPH-AR, en la curva COR se muestra con mayor especificidad que las dos variables tienen una empatía similar.

DISCUSIÓN

Se ha probado que la infección con VPH-AR es un prerrequisito necesario para desarrollo de cáncer cervical, y la OMS ha reconocido que los VPH 16 y 18 son agentes carcinógenos en humanos. La prueba de VPH con sensibilidad del 95% y una especificidad del 94 % en mujeres mayores de 30 años por disminución en la capacidad de eliminar las lesiones, presentando una infección persistente, por lo tanto la viabilidad para poder diagnosticar lesiones de alto riesgo es también más elevada.

En este protocolo hallamos que las pacientes que presentan VPH 18 se encuentran entre los 35 a los 39 años y de los 50 a los 54 años; pero las pacientes con más carga probable a salir positivas en una prueba VPH 16 y VPH 16-18 son aquellas que se encuentran entre los 45 a los 49 años de edad. En nuestro servicio, la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC1, NIC 2) suman 14 pacientes (12.6%), la Atipia de Significado Indeterminado (ASC-US) conserva a 7 pacientes (6.3%) .

La asociación de resultados positivos a citología cervical convencional (NIC 1 y NIC2) y la prueba PCR para VPH-AR encontramos asociación en prevalencia de 8.1% con resultado positivo a citología y VPH-AR genotipo 16, 2.7% positivo a citología convencional y a VPH-AR genotipo 18, y un mismo patrón de prevalencia en aquellas positivas a citología cervical con PCR VPH genotipo 16-18 en 1.8% de las 111 pacientes incluidas en el protocolo. Esto nos ayuda a desarrollar protocolos de manejo y tratamiento en pacientes con genotipos de VPH de alto riesgo.

Se analizaron gráficos de dispersión para establecer la sensibilidad de ambas pruebas, así mismo se aplicó la curva COR, mostrando que existe relación directa entre ambas pruebas, sin embargo siendo esta relación bastante estrecha entre los resultados positivos con citología cervical convencional y PCR para VPH-AR, en la curva COR se muestra con mayor especificidad que las dos variables tienen una empatía similar. El cálculo de t de student asume tomar en cuenta la hipótesis alternativa por lo tanto la prueba PCR es más sensible aunque la significancia de la sensibilidad no es tan representativa al momento.

Los datos estudiados ejercen un peso sobre los tratamientos y las investigaciones póstumas ya que nos ayudaron a localizar; de manera empírica, los factores de riesgo para el probable desarrollo de Cáncer Cervicouterino en pacientes con ciertas características. Lo que se pretende es conocer a las pacientes con alto riesgo de progresar a cáncer cervicouterino invasor, así mismo correlacionar su resultado con la citología cervical; el uso de la nueva prueba de PCR nos permitirá desarrollar protocolos de prevención y manejo para este tipo de pacientes en nuestro hospital e interior de la república para con esto lograr un mejor seguimiento y tratamiento oportuno de la patología.

CONCLUSIONES

Se incluyeron a 111 pacientes femeninas de 35 hasta 64 años de edad, del servicio de colposcopia en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos ISSSTE que acudieron a toma de muestra para PCR y Citología Cervical.

La evidencia reporta que podría considerarse como factor de riesgo; para el desarrollo de Cáncer Cervicouterino, la edad y un resultado positivo de las pruebas mencionadas.

Obtuvimos que la relación observada entre la edad y los positivos a la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC I, I/LEIBG, II) es positiva en el análisis ya que el rango de edad con mayor número de pacientes es el que va de 35 a 39 años y representa el 5.4% las siguientes pacientes con resultados positivos se encuentran entre los 45 años hasta los 64 años, equivalentes al 7.2%. El resultado Positivo a VPH 16-18 presenta una frecuencia máxima en el rango de edad de entre 45 a 49 años; 50% de las 6 pacientes positivas en esta clasificación. La asociación de pruebas positivas a PCR VPH-AR y citología convencional positiva (NIC I, NIC I/LEIBG, NIC II) se encuentra con una prevalencia de 8.1 % para genotipo 16, 2.7% para genotipo 18 y 1.8% para genotipo 16 y 18.

Actualmente la medicina debe enfocarse en la prevención de las enfermedades antes que en la curación de las mismas, siendo de gran importancia para con ello evitar su presentación y complicaciones posteriores. Con este estudio pudimos analizar que la citología cervical ha contribuido enormemente a la reducción de la morbimortalidad del cáncer cervicouterino siendo en primera instancia el principal método de detección, por lo que es indispensable la formación de Citotecnólogos en todos los países en vías de desarrollo y el uso de los instrumentos que mejoren la calidad de la muestra celular como es la brocha de polietileno en nuestro caso. Con la nueva prueba de detección de VPH-AR para detectar los genotipos 16 y 18 se logra analizar la presencia de virus de alto riesgo oncogénicos analizando que existe una relación directa entre las variables analizadas en citología cervical convencional y PCR para detección de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino, mostrando una mayor sensibilidad y especificidad para la prueba PCR, brindándonos información importante para continuar con estas pruebas de detección en nuestro programa de salud de manera imprescindible.

TABLAS Y GRÁFICAS

TOTAL DE PACIENTES ESTUDIADAS CON PCR POSITIVO A VPH-AR 16-18 EN SERVICIO DE COLPOSCOPIA HRLALM										
HRLALM	Total de muestras procesadas	Total de pacientes Negativos a 16 y 18	Total de pacientes positivo 16 y 18	Citología Negativa en px (+) 16 y 18	Citología Proceso inflamatorio en px (+) 16 y 18	Positivo ASCUS/LEIBG en px (+) 16 y 18	Citología positiva en px (+) 16 y 18	Positivos 16	Positivos 18	Positivo 16-18
COLPOSCOPIA	1237	1089	148	36	80	13	19	106	35	7

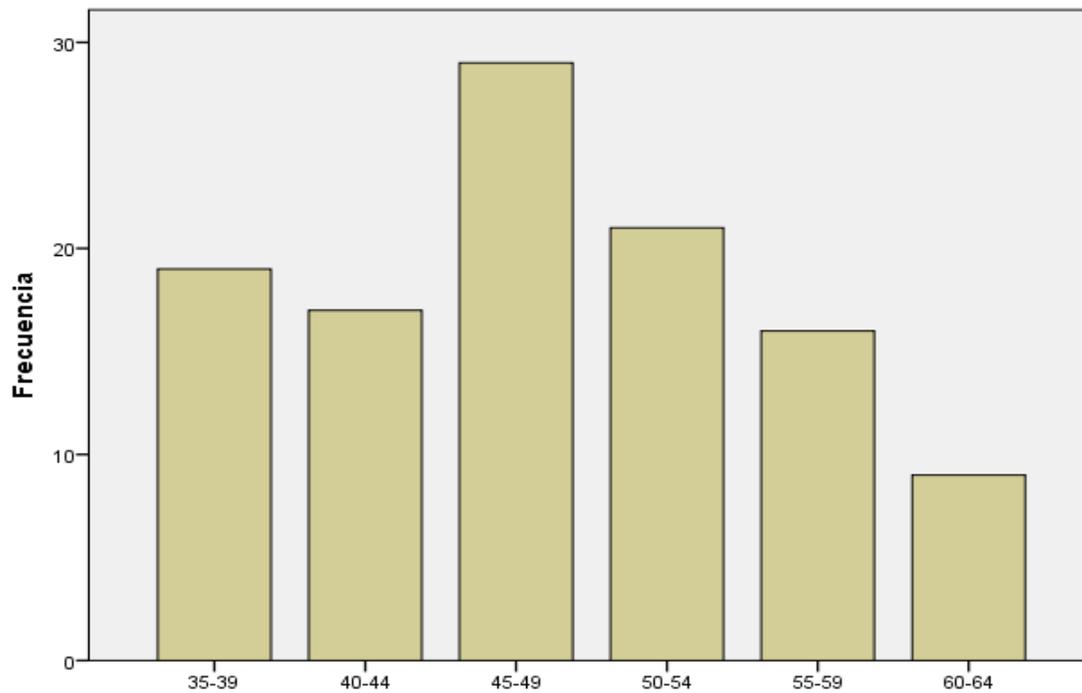
Tab Datos 1. Tabla de recolección de datos en total de pacientes con prueba PCR; positividad a VPH-AR 16 y 18, con resultados de citología convencional

MUESTRA PACIENTES ENTRE 35 Y 64 AÑOS DE EDAD CON PCR POSITIVO A VPH-AR 16 Y 18 EN SERVICIO DE COLPOSCOPIA HRLALM										
HRLALM	Total de pacientes positivos 16 y 18	Total de pacientes excluidos por edad	Total de muestra	Citología Negativa en px (+) 16 y 18	Citología Proceso inflamatorio en px (+) 16 y 18	Positivo ASCUS/LEIBG en px (+) 16 y 18	Citología positiva NIC I o NIC II en px (+) 16 y 18	Positivos 16	Positivos 18	Positivo 16-18
PACIENTE	148	37	111	27	62	8	14	77	28	6

Tab Datos 2. Tabla de recolección de datos en muestra de pacientes entre 35 y 64 años de edad con prueba PCR positiva a VPH-AR 16 y 18 con resultados de citología convencional

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	35-39	19	17,1	17,1	17,1
	40-44	17	15,3	15,3	32,4
	45-49	29	26,1	26,1	58,6
	50-54	21	18,9	18,9	77,5
	55-59	16	14,4	14,4	91,9
	60-64	9	8,1	8,1	100,0
	Total	111	100,0	100,0	

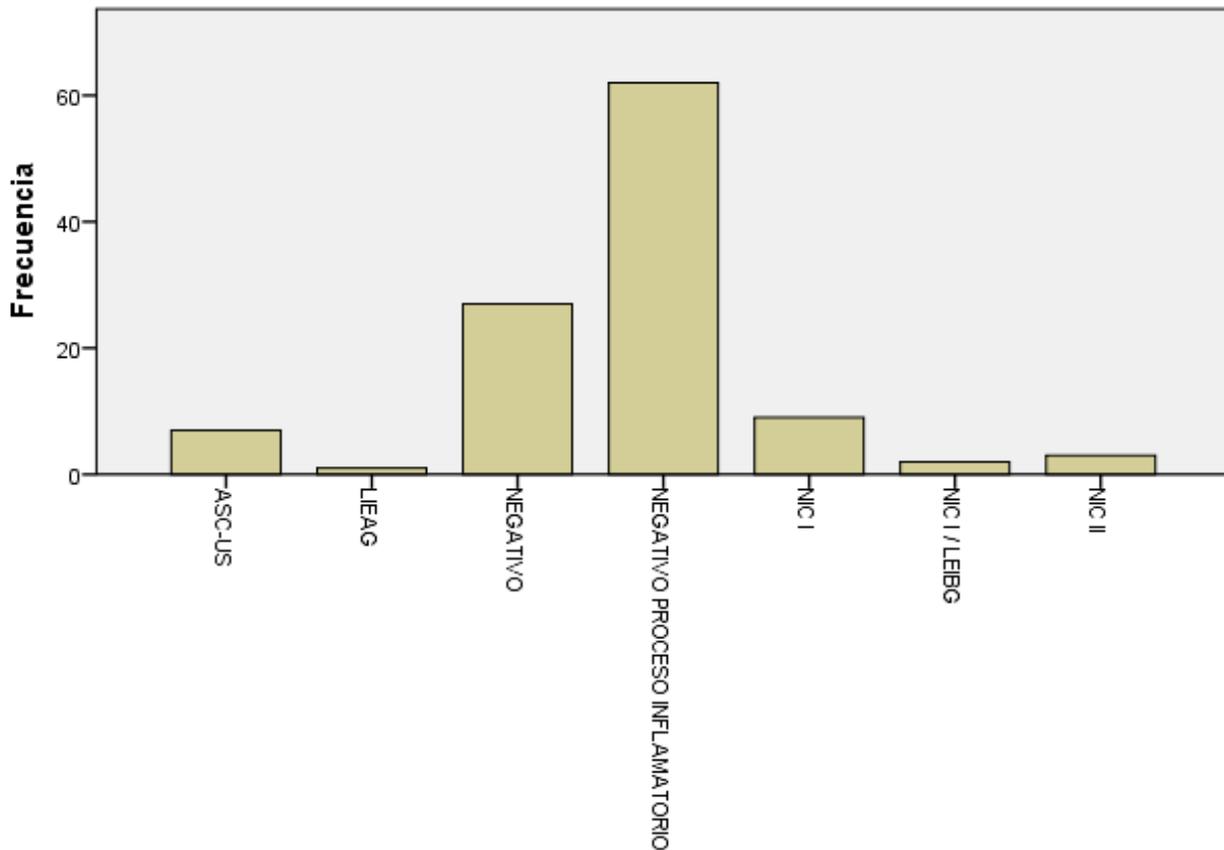
Fig. 1 Tabla de distribución de la variable Edad de la Paciente en pacientes con Resultados positivos a VPH-AR 16 y 18



Graf. 1 Distribución de la variable Edad del Paciente en pacientes con Resultados positivos a VPH-AR 16 y 18

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	ASC-US	7	6,3	6,3	6,3
	LIEAG	1	,9	,9	7,2
	NEGATIVO	27	24,3	24,3	31,5
	NEGATIVO PROCESO INFLAMATORIO	62	55,9	55,9	87,4
	NIC I	9	8,1	8,1	95,5
	NIC I / LEIBG	2	1,8	1,8	97,3
	NIC II	3	2,7	2,7	100,0
	Total	111	100,0	100,0	

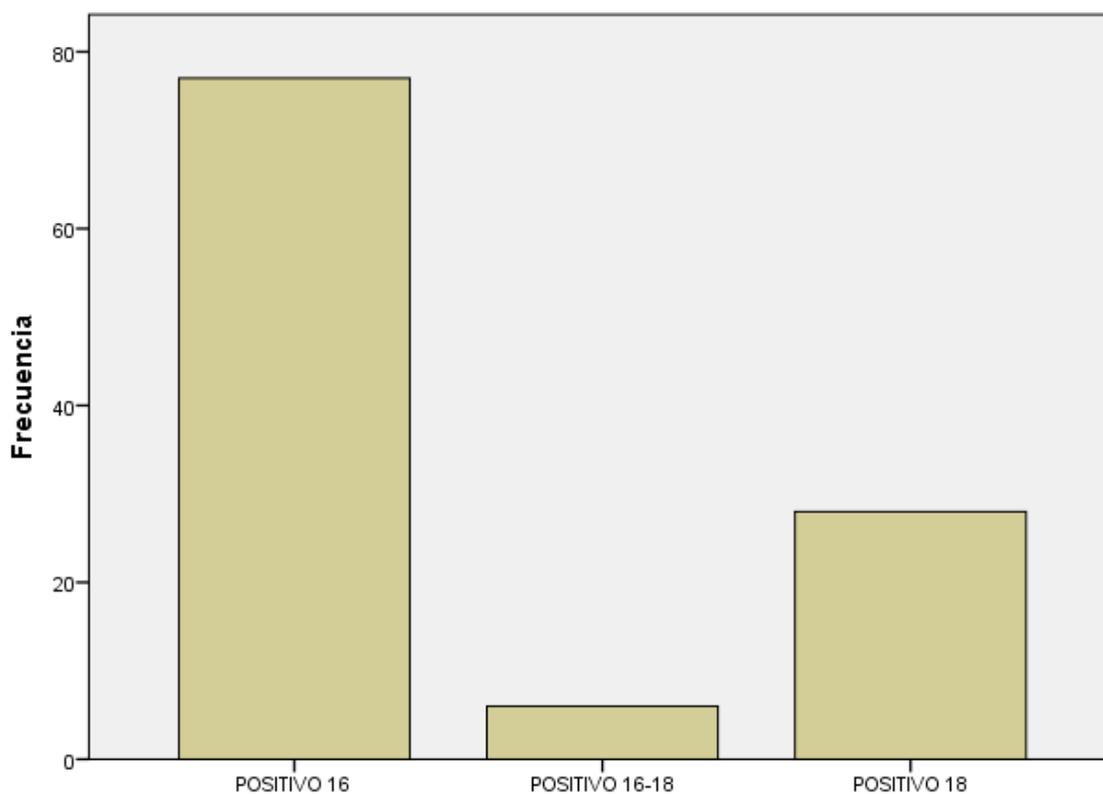
Fig. 2 Distribución de la variable Resultados de la Citología Cervical en pacientes de 35 a 64 años de edad con resultado positivo a VPH-AR 16 y 18



Graf. 2 Distribución de la variable Resultados de la Citología Cervical en pacientes de 35 a 64 años de edad con resultado positivo a VPH-AR 16 y 18

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	POSITIVO 16	77	69,4	69,4	69,4
	POSITIVO 16-18	6	5,4	5,4	74,8
	POSITIVO 18	28	25,2	25,2	100,0
	Total	111	100,0	100,0	

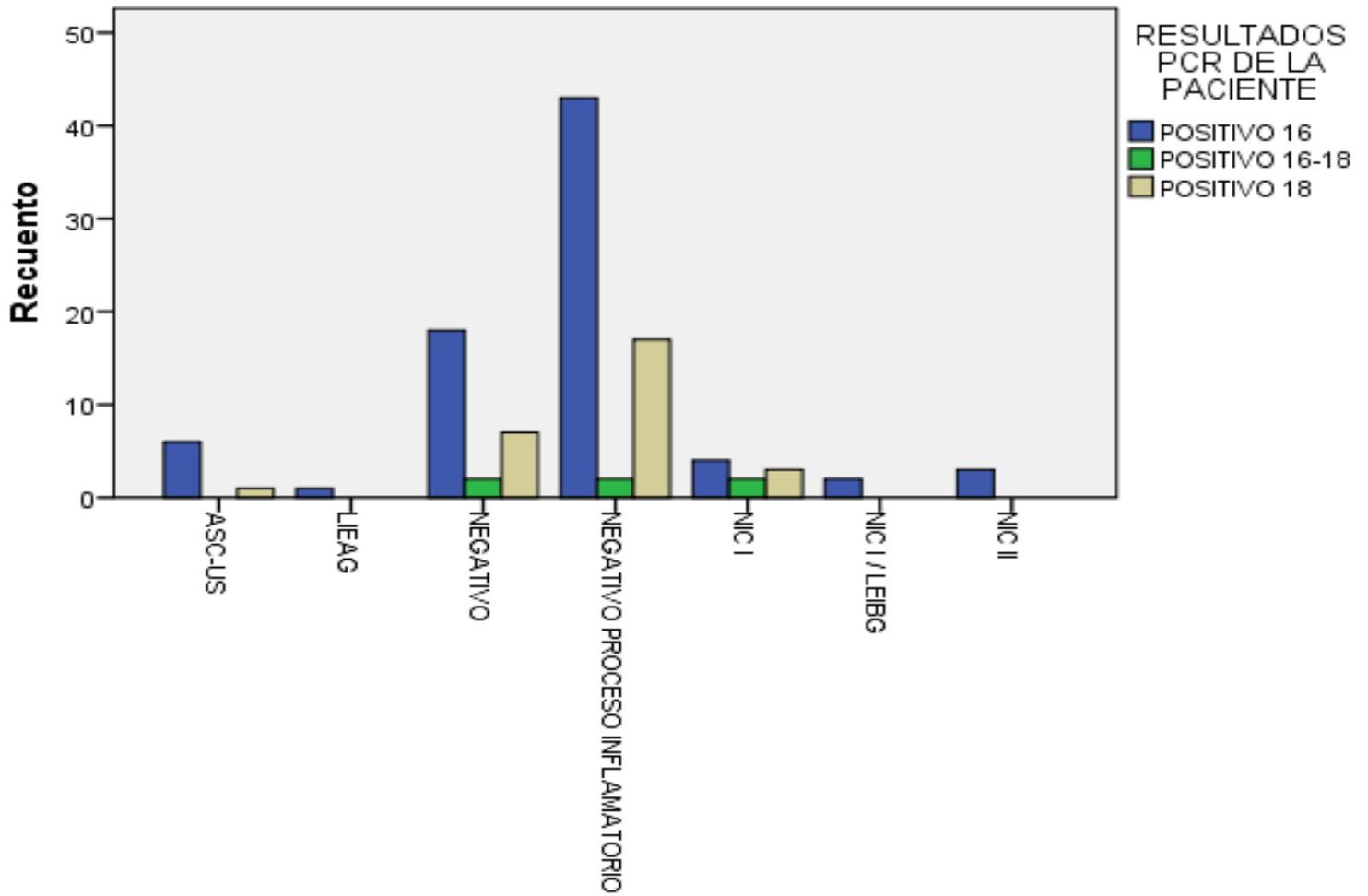
Fig. 3 Distribución de la variable Resultados de PCR positivos a VPH-AR 16 y 18 en rango de edad de 34 a 65 años



Graf. 3 Distribución de la variable Resultados de PCR positivos a VPH-AR 16 y 18 en rango de edad de 34 a 65 años

			EDAD DE LA PACIENTE						Total
			35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	
RESULTADOS CITOLOGIA CERVICAL DE LA PACIENTE	ASC-US	Recuento	1	1	5	0	0	0	7
		% del total	0,9%	0,9%	4,5%	0,0%	0,0%	0,0%	6,3%
	LIEAG	Recuento	0	1	0	0	0	0	1
		% del total	0,0%	0,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%
	NEGATIVO	Recuento	4	5	7	5	3	3	27
		% del total	3,6%	4,5%	6,3%	4,5%	2,7%	2,7%	24,3%
	NEGATIVO PROCESO INFLAMATORIO	Recuento	8	10	16	14	9	5	62
		% del total	7,2%	9,0%	14,4%	12,6%	8,1%	4,5%	55,9%
	NIC I	Recuento	4	0	1	1	3	0	9
		% del total	3,6%	0,0%	0,9%	0,9%	2,7%	0,0%	8,1%
	NIC I / LEIBG	Recuento	0	0	0	1	1	0	2
		% del total	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%	0,9%	0,0%	1,8%
	NIC II	Recuento	2	0	0	0	0	1	3
		% del total	1,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,9%	2,7%
	Total	Recuento	19	17	29	21	16	9	111
		% del total	17,1 %	15,3 %	26,1%	18,9%	14,4 %	8,1%	100,0%

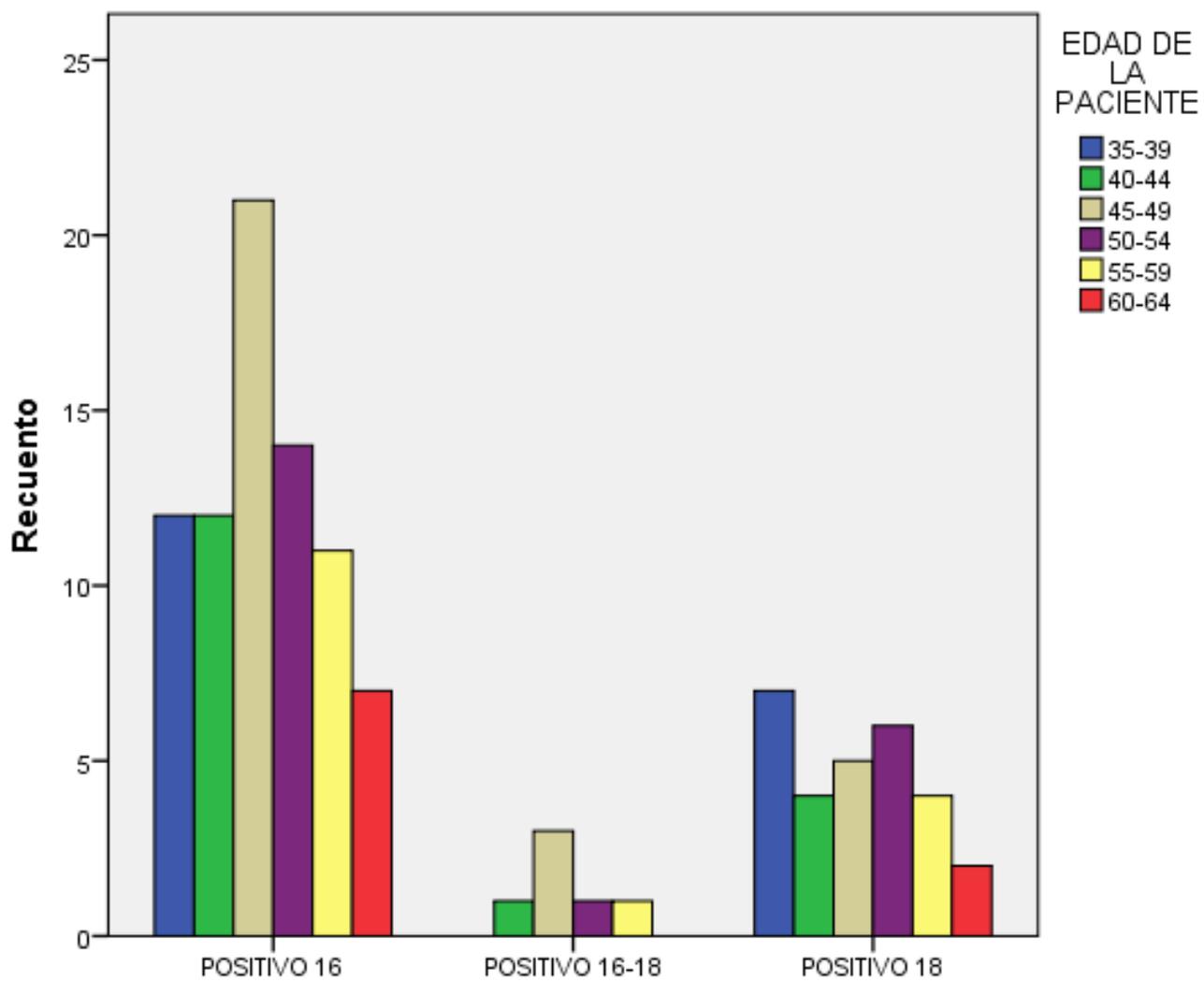
Fig. 4 Tabla de Contingencia de las variables Resultados de la Citología Cervical vs Edad



Graf. 4 Contingencia de las variable Resultados de Citología Cervical vs Edad de la paciente (34 a 65 años) positivos a VPH-AR 16 y 18 en PCR

			EDAD DE LA PACIENTE						Total
			35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	
RESULTADOS PCR DE LA PACIENTE	POSITIVO 16	Recuento	12	12	21	14	11	7	77
		% del total	10,8%	10,8%	18,9%	12,6%	9,9%	6,3%	69,4%
	POSITIVO 16-18	Recuento	0	1	3	1	1	0	6
		% del total	0,0%	0,9%	2,7%	0,9%	0,9%	0,0%	5,4%
	POSITIVO 18	Recuento	7	4	5	6	4	2	28
		% del total	6,3%	3,6%	4,5%	5,4%	3,6%	1,8%	25,2%
Total		Recuento	19	17	29	21	16	9	111
		% del total	17,1%	15,3%	26,1%	18,9%	14,4%	8,1%	100,%

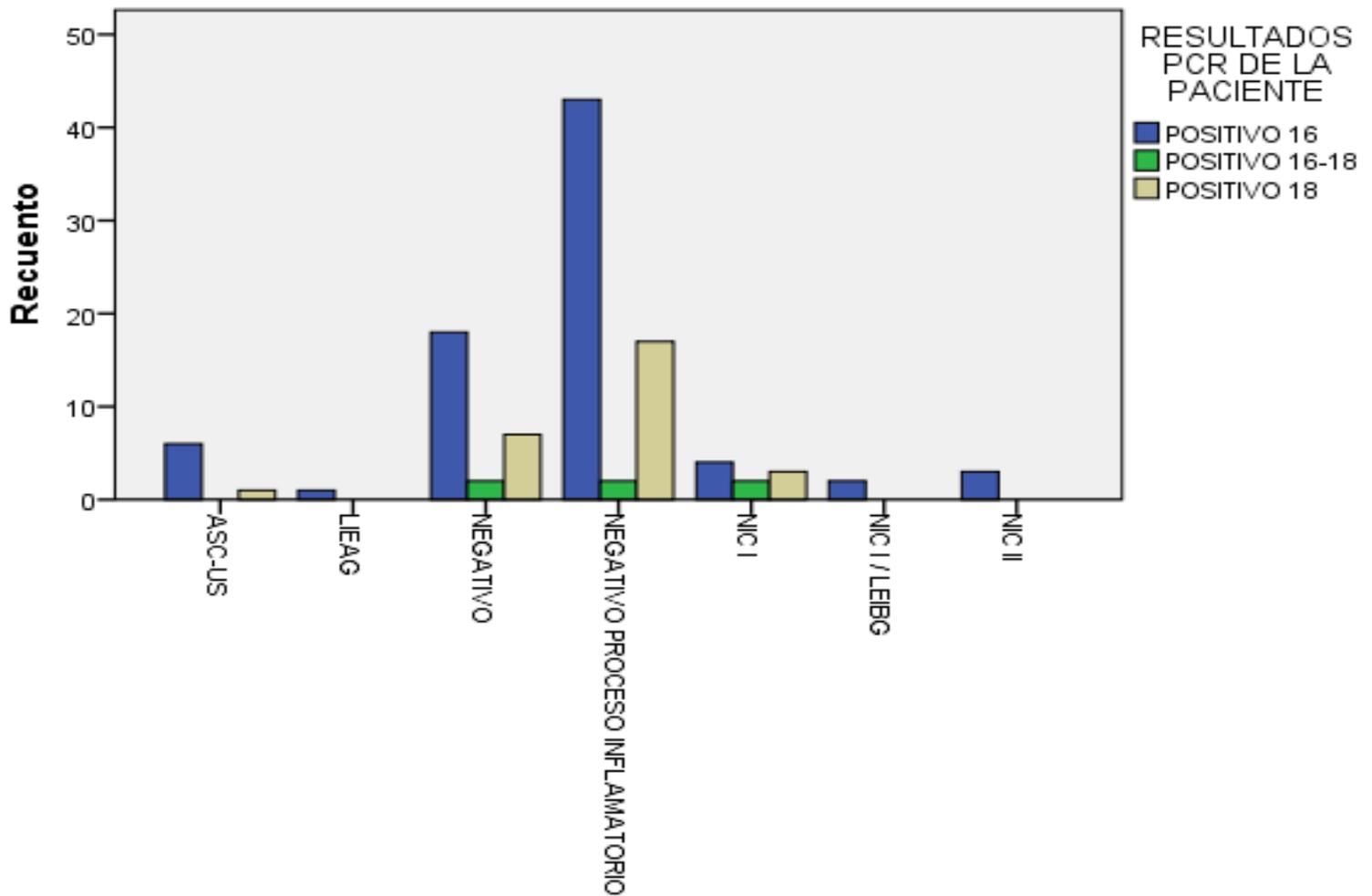
Fig. 5 Tabla de Contingencia de las variables Resultados de PCR positivos a VPH-AR 16 y 18 vs Edad del Paciente



Graf. 5 Contingencia de las variables Resultados de PCR positivos a VPH-AR 16 y 18 vs Edad del Paciente

			RESULTADOS PCR DE LA PACIENTE			Total
			POSITIVO 16	POSITIVO 16- 18	POSITIVO 18	
RESULTADOS PAPANICOLAU DE LA PACIENTE	ASC-US	Recuento	6	0	1	7
		% del total	5,4%	0,0%	0,9%	6,3%
	LIEAG	Recuento	1	0	0	1
		% del total	0,9%	0,0%	0,0%	0,9%
	NEGATIVO	Recuento	18	2	7	27
		% del total	16,2%	1,8%	6,3%	24,3%
	NEGATIVO PROCESO INFLAMATORIO	Recuento	43	2	17	62
		% del total	38,7%	1,8%	15,3%	55,9%
	NIC I	Recuento	4	2	3	9
		% del total	3,6%	1,8%	2,7%	8,1%
	NIC I / LEIBG	Recuento	2	0	0	2
		% del total	1,8%	0,0%	0,0%	1,8%
	NIC II	Recuento	3	0	0	3
		% del total	2,7%	0,0%	0,0%	2,7%
Total	Recuento	77	6	28	111	
	% del total	69,4%	5,4%	25,2%	100,0 %	

Tabla Contingencia. Resultados citológicos * PCR positivos a VPH-AR 16 y 18



Graf. Contingencia de las variables Resultados Citológicos vs Resultados PCR positivos a VPH-AR 16 y 18

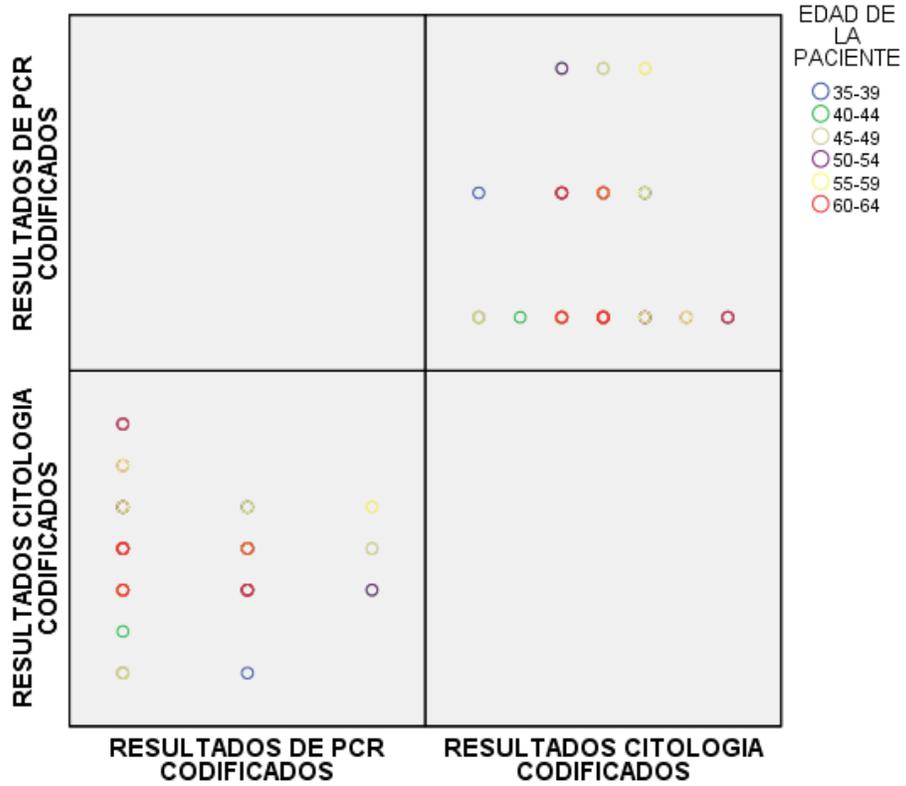
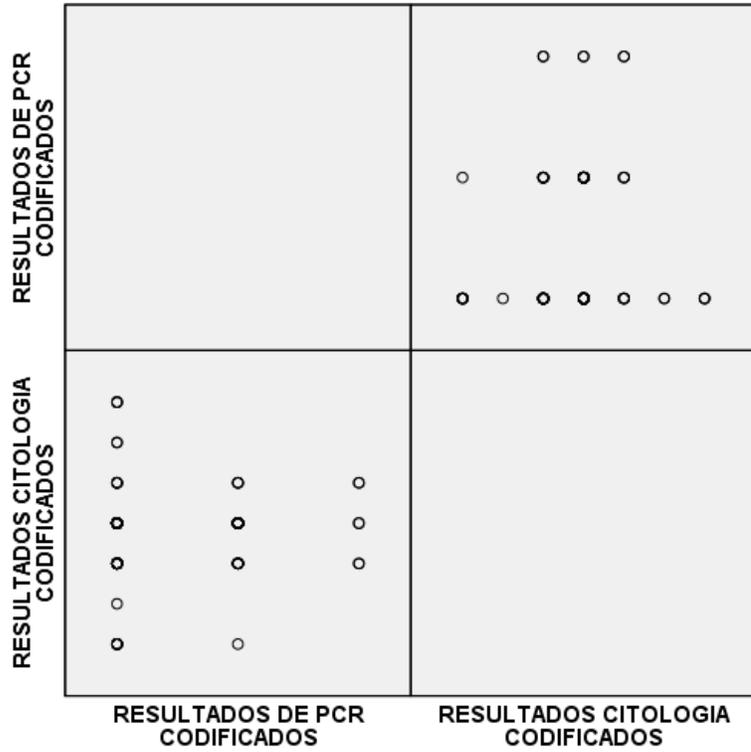
Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,276	12	,592
Razón de verosimilitudes	10,522	12	,570
N de casos válidos	111		

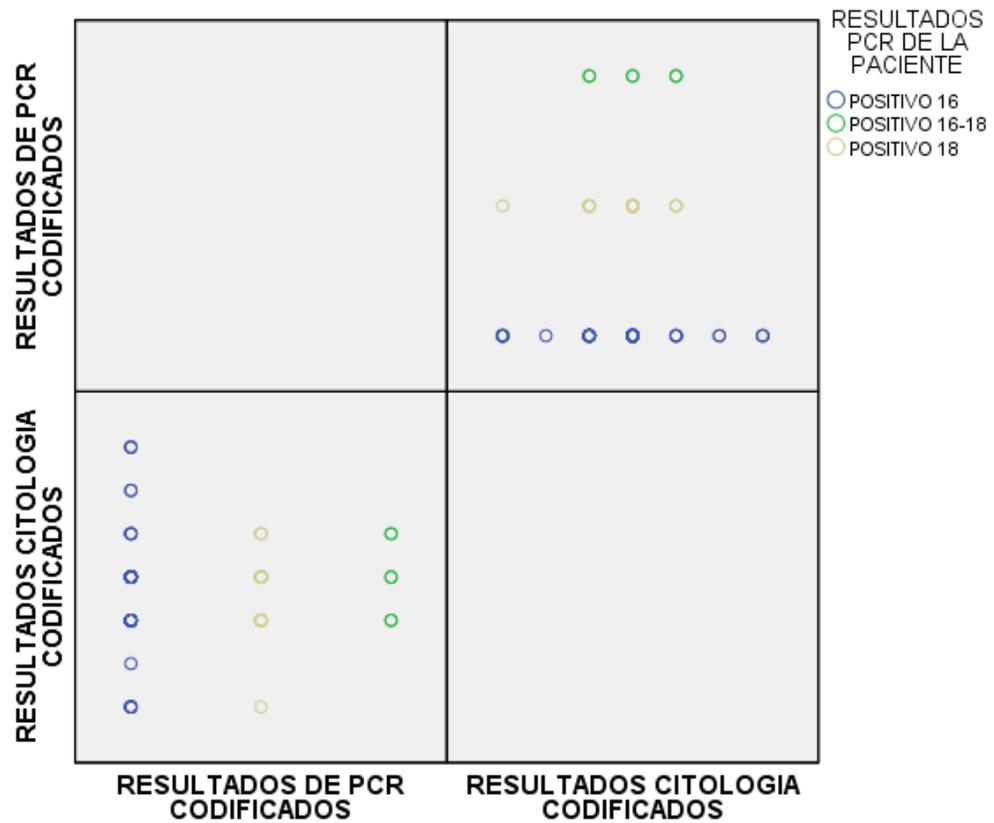
Medidas simétricas		
	Valor	Sig. aproximada
Phi	,304	,592
Nominal por nominal V de Cramer	,215	,592
Coeficiente de contingencia	,291	,592
N de casos válidos	111	

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

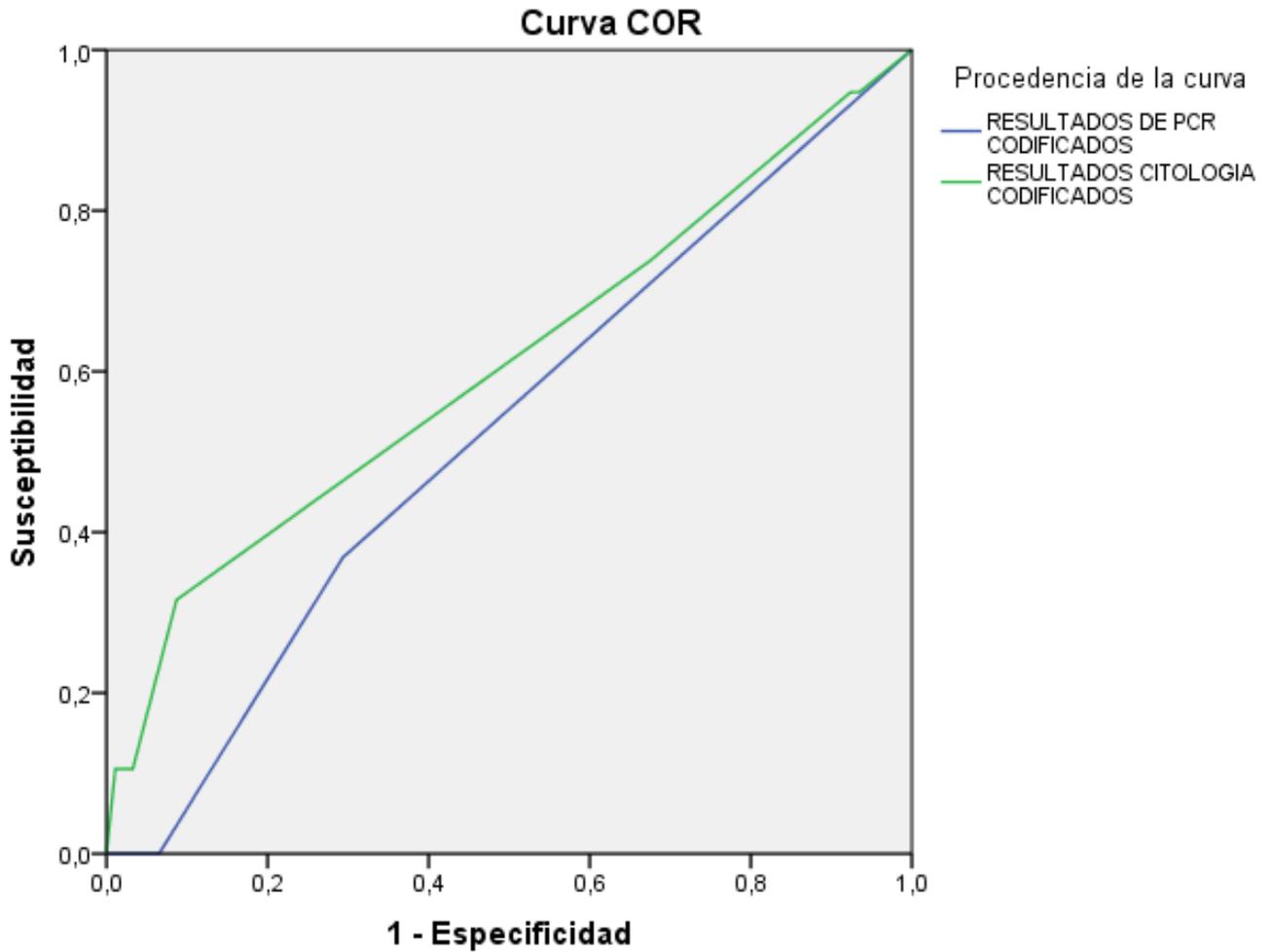
Prueba para una muestra						
	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
RESULTADOS DE PCR CODIFICADOS	24,519	110	,000	1,360	1,25	1,47

**Graficas de dispersión para establecer sensibilidad de la citología cervical
convencional vs PCR positivo a VPH-AR 16 y 18**





Resumen del proceso de casos	
EDAD DE LA PACIENTE	N válido (según lista)
Positivo ^a	19
Negativo	92
Los valores mayores en la variable de resultado de contraste indican una mayor evidencia de un estado real positivo.	
a. El estado real positivo es 35-39.	



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Área bajo la curva	
Variables resultado de contraste	Área
RESULTADOS DE PCR CODIFICADOS	,525
RESULTADOS CITOLOGIA CODIFICADOS	,608
La variable (o variables) de resultado de contraste: RESULTADOS DE PCR CODIFICADOS , RESULTADOS CITOLOGIA CODIFICADOS tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo.	
Los estadísticos pueden estar sesgados .	

ANEXOS



Carta de Consentimiento informado



Fecha _____

Nombre: _____

En calidad de paciente del servicio de Colposcopia del Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos" del I.S.S.S.T.E.

No. expediente _____

Acepto: Que el Doctor

Médico del servicio de colposcopia me informo en forma entendible lo siguiente:

- 1.- En qué consiste el procedimiento para la toma del estudio de citología (conocido como Papanicolaou).
- 2.- En qué consiste el procedimiento de toma de la prueba de PCR para detección del ADN del virus del papiloma humano.
- 3.- En qué consiste el procedimiento para la toma de una biopsia en caso de requerirse de acuerdo a mi evaluación clínica.
- 4.- En qué consisten los procedimientos terapéuticos como: criocirugía, esferolisis, conización con electrocirugía o láser.
- 5.- Me explico de manera clara, completa y oportuna las posibles complicaciones que se pueden presentar durante la realización de los mismos así como los posibles resultados así como que el plan de tratamiento a seguir dependerá de los mismos acorde a las normas y lineamientos para tal efecto.
- 6.- Por lo que tengo la información completa, no presentándose ninguna duda.

Firma del Médico tratante

Firma de la paciente

Firma del familiar o representante legal

Testigo

Testigo

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

NOMBRE DE LA PACIENTE:

NÚMERO DE EXPEDIENTE:

EDAD:

RESULTADO CITOLOGIA CERVICAL

RESULTADO PCR (COBAS)

COMENTARIOS:

ATENTAMENTE

Dra. Brenda Valeria Gabilondo Acevedo

Investigador Principal

BIBLIOGRAFÍA

1. María Luisa Mateos, Evaluación de un sistema de PCR a tiempo real (cobas 4800) para la detección separada de los genotipos 16 y 18 y otros genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano en la prevención del cáncer cervical *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(6):411–414
2. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 guías de consenso para el tratamiento de mujeres con resultados anormales en las pruebas de detección de cáncer cervical. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197:346-355.
3. Susanne Kjaer K, la persistencia tipo específico de virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH) como indicador de lesiones de alto grado escamosa intraepitelial cervical en las mujeres jóvenes: basados en la población siga posibles hasta estudio, el volumen *BMJ* 325 14 de septiembre 2002
4. Wright TC et al: 2006 guías de consenso para el tratamiento de mujeres con resultados anormales en las pruebas de detección de cáncer cervical. *Am J Obstet Gynecol* 197 (4): 346-55
5. van Hamont D et al. 2006. Evaluación de la SPF10-INNO LiPA virus del papiloma humano (VPH) prueba de genotipo y el roche de disposición lineal la prueba del VPH genotipo. *J Clin Microbiol.*44 (9) :3122-9
6. Coutlée F et al. 2006. Mejorar la detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) en muestras de ADN con cebadores PGMY anogenital y la matriz lineal de la prueba del VPH genotipo. *J Clin Microbiol.* 44 (6) :1998-2006
7. Meijer CJ, Snijders PJ, el Castillo de PE. Utilidad clínica de la determinación del genotipo del VPH. *Gynecol Oncol.* 2006, 103:12-17.
8. MJ Khan, el Castillo de PE, Lorincz A, et al. Elevado a 10 años el riesgo de lesiones precancerosas de cuello uterino y el cáncer en las mujeres con virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 o 18 años y la posible utilidad de los tipos específicos de las pruebas del VPH en la práctica clínica. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1072-1079.
9. C.Wright T, Stoler M, Behrens C, et al Genotipado del VPH en el contexto de protocolos de cribado y Triage del VPH, Editor, HPV TODAY, N°25 mayo 2012., Columbia University Medical CENTER.
10. Doorbar J, Infeccion por VPH, naturaleza de la célula infectada y desenlace de patologías cervicales, Division de Virología, National Institute for medical Research, Mill Hill, Londres, Reino Unido, 2012

11. Pajtler M, Milicic-Juhas V, Milojkovic M, et al. aSSESSMENT OF HPV DNA test value in management women with cytological findings of ASC-US, CIN1 and CIN 2, *Antropol.* 34 (2010) 1:81-86.
12. De la Torre F, Lesión premaligna escamosa del cuello uterino, un enfoque actualizado, *Patología* 2008; 46 (4):332-42.
13. Gutiérrez Rojo R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino, *Archivos Médicos de Actualización en Tracto Genital Inferior*, Año III – Núm. 5: 16-24, octubre 2011.
14. Maynard MH, duarte Franco E: Rodríguez J, Stephen DW, Hanley J, Ferenczy A, et al. For the Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cáncer. *N Engl J Med.* 2007; 357:1579-88.
15. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *J Low Genit Tract Dis.* 2012
16. Wright TC Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens CM, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am J ClinPathol.* 2011;135(3):468-475.