



Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA PCR EN
TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE ADN
GENÓMICO DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO
DE ALTO RIESGO**

**REALIZADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO DEL
HOSPITAL LAS HIGUERAS DE TALCAHUANO**

POR BRIAN EDUARDO MELLA GODOY

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado en la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título
profesional de Bioquímico

Profesora Patrocinante

Dra. Paulina Bustos Araya
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Profesional Guía

BQ. Eduardo Ross Riffo
Sección de Biología Molecular
Laboratorio Clínico
Hospital las Higueras

Septiembre, 2021

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



© 2021, Brian Eduardo Mella Godoy



A mis padres por siempre haberme brindado todo su apoyo y amor.
A mis tres hermanos y sobrina Amanda que siempre me han acompañado.
A mi polola por todo su cariño y los buenos momentos que hemos vivido.
A mis amigos que hicieron de este proceso una grata experiencia.
A mi profesora patrocinante Paulina Bustos por su gran disposición para orientarme durante el transcurso de este trabajo.
A mi profesional guía Eduardo Ross que me guío durante el desarrollo de mi internado.
A los miembros de mi comisión Daniel Durán y Andrés Opazo por cada uno de sus comentarios.
A todos los miembros del Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano.

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	vii
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 Historia,	1
2.2 Generalidades y Clasificación.	2
2.3 Estructura viral.....	5
2.4 Genoma viral del VPH:	6
2.5 Proteínas del VPH.	7
2.6 Ciclo de vida del virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-ar).....	9
2.7 Epidemiología del VPH-ar y la asociación con el CCU.....	12
2.8 Patogenia de los VPH-ar.	13
2.9 Clínica del VPH-ar y su relación con el CCU.....	16
2.10 Diagnóstico de genotipos virales de VPH-ar.	18
2.11 Vacunas contra el VPH-ar.	19
3. PROBLEMA.....	20
4. PREGUNTA.....	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo general:.....	21
6.2 Objetivos específicos:.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Diseño del estudio.	22
7.2 Criterios de inclusión y exclusión del estudio.	22
7.3 Equipos y materiales	23
7.3.1 Reactivos.....	23
7.3.2 Instrumentación y software.....	24
7.3.3 Materiales extras requeridos pero no suministrados	24
7.4. RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS	25
7.4.1 Recolección de especímenes.....	25
7.4.2 Transporte de muestras	25
7.4.3 Almacenamiento de muestras	26
7.5 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE QPCR EN EL EQUIPO COBAS 4800	26
7.5.1 Cantidad de muestras y número de pruebas por kits	26
7.5.4 Procesamiento completo de las muestras para detección de VPH-ar.	30
8. RESULTADOS.....	32
8.1 Detección y genotipificación de los VPH-ar mediante la técnica de PCR en tiempo real en el equipo automatizado Cobas 4800.....	32
8.2 Confección del protocolo de procedimientos necesarios para la detección de ADN genómico de VPH-ar en el equipo Cobas 4800, mediante la técnica de qPCR.	46
9. DISCUSIÓN.....	47
10. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	55
11. ANEXO	63

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Resumen de los principales genotipos del VPH, su tropismo y enfermedades asociadas (Harden et al., 2017).....	4
Tabla 2. Proteínas del VPH y funciones asociadas.	8
Tabla 3. Informe de resultados e interpretación para la prueba de VPH-ar mediante el equipo Cobas 4800.	31
Tabla 4. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019.	33
Tabla 5. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha noviembre de 2019.	33
Tabla 6. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha diciembre de 2019.	35
Tabla 7. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha enero de 2020.	36
Tabla 8. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha febrero de 2020.	37
Tabla 9. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha marzo de 2020.	38
Tabla 10. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha abril de 2020.	39
Tabla 11. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.	40
Tabla 12. Exámenes de VPH positivos y negativos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.	41
Tabla 13. Exámenes de VPH-ar positivos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.	42
Tabla 14. Porcentajes de exámenes de VPH-ar positivos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.	43
Tabla 15. Rango etario y coinfecciones por detección de más de un genotipo de VPH-ar.....	43
Tabla 16. Valores observados de los exámenes negativos y positivos de VPH-ar clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes.	44
Tabla 17. Porcentaje de distribución para cada genotipo de VPH-ar clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes.	45
Tabla 18. Valores esperados de exámenes positivos para VPH-ar para un total de 4.202 muestras.	45
Tabla 19. Prueba de X ² de Pearson con 18 grados de libertad y un nivel de significancia de 5%.	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Papillomavirus</i>	5
Figura 2. Genoma del VPH	7
Figura 3. Ciclo de vida del VPH	11
Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis del virus papiloma humano (VPH)	16
Figura 5. Aislamiento de ácidos nucleicos utilizando partículas de vidrio magnéticas	27
Figura 6. Esquema del procesamiento de muestras de cuello uterino para la detección de VPH-ar	30
Figura 7. Porcentaje de positividad para los distintos genotipos de VPH de alto riesgo evaluados	42



1. RESUMEN.

El virus papiloma humano (VPH) se transmite principalmente por contacto piel a piel y en zonas mucosas como la anogenital. Los genotipos de VPH que pertenecen al grupo de alto riesgo (VPH-ar) tienen una alta probabilidad de desarrollar patologías oncogénicas donde destaca el cáncer cérvico uterino (CCU), por esto es de gran importancia el uso de nuevas técnicas diagnósticas que se complementen con las ya empleadas. El objetivo de este trabajo fue la implementación de la técnica de PCR en tiempo real para la detección del ADN genómico de los VPH-ar más frecuentes, para ello se utilizó el equipo automatizado Cobas 4800 ubicado en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano. Para el estudio se emplearon muestras de citologías cervicales a las cuales se les realizó el debido procesamiento y control interno de celularidad (β -globina) para la detección de VPH-ar en forma específica y con alta sensibilidad. La implementación de esta técnica permitió realizar el diagnóstico molecular específico de los genotipos de VPH-ar a mujeres mayores o igual a 30 años, en donde se procesó un total de 4.202 muestras, siendo positivas 102 para VPH 16, 35 para VPH 18 y 412 para los 12 VPH-ar agrupados, además proporcionó información sobre la presencia de los distintos genotipos oncogénicos en la Provincia de Concepción donde la prevalencia fue en promedio de 13%, finalmente mediante un test estadístico de X^2 de Pearson se concluyó además que la infección por VPH-ar es dependiente de la edad de la paciente.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Historia.

Los primeros estudios sobre VPH (virus papiloma humano) y cancer cérvico uterino (CCU) se remontan a la década de 1970, cuando el médico y profesor Zur Hausen y colaboradores se propusieron esclarecer la asociación etiológica entre el VPH y el CCU, ya que se pensaba que era causado por el virus herpes simple tipo 2 (VHS-2) (De la Fuente *et al*, 2010). A través de sus análisis demostraron que los VPH correspondían a una familia con amplia heterogeneidad y lograron con ello ser el primer grupo de investigación a finales de los años 70 en aislar el VPH-6 desde biopsia de verruga genital. Posteriormente se describió el VPH-11 (Gissmann *et al*, 1983), VPH-16 (Dürst *et al.*, 1983) y VPH-18 (desde biopsias de cáncer cervical) (Boshart *et al.*, 1984). De esta manera se propuso la hipótesis de que el VPH es el principal involucrado en el desarrollo de cáncer de cérvix. Finalmente, por todos los aportes y nuevos descubrimientos, se le otorgó en el año 2009 el Premio Nobel de Medicina a Harald Zur Hausen, por la evidencia entre la relación del CCU y la infección por el VPH (Zur Hausen., 2000).

2.2 Generalidades y Clasificación.

Los VPH taxonómicamente se encuentran agrupados dentro de la familia *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004). Los virus papiloma (VP) son altamente especie-específicos, pudiendo encontrarse además del hombre en reptiles (Herbst *et al.*, 2009), aves (Terai *et al.*, 2002) y otros mamíferos (Bernard *et al.*, 2010).

Se han logrado identificar más de 200 tipos diferentes de VP, de los cuales 120 infectan al hombre y se han organizado principalmente en 5 géneros: Alpha-PV, Beta-PV, Gamma-PV, Mu-PV y Nu-PV (Van Doorslaer *et al.*, 2013). Además, una clasificación más específica se propuso utilizando como determinante la porción con menor variabilidad del genoma del VPH correspondiente a la región L1: si existe una homología menor del 90% se define como un nuevo tipo (se asocia un número), cuando alcanza entre 90 y 98% se considera subtipo (asociado a una letra) y con una identidad del 98% o más se dice que es una variante (Concha, 2007).

Se conocen alrededor de 40 tipos que tienen tropismo por la mucosa anogenital de gran interés por las patologías asociadas (Chan *et al.*, 2019). Los genotipos que infectan las zonas de la mucosa anogenitales se pueden separar en:

- Genotipos de alto riesgo oncogénico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59.
- Genotipos de probable alto riesgo oncogénico: 64, 65, 67, 68, 69, 70, 73, 82.
- Genotipos de posible alto riesgo oncogénico 26, 53, 66
- Genotipos de bajo riesgo (no oncogénicos): 6, 11 (más comunes).

Aunque hay otras clasificaciones menos estrictas, éstos son los genotipos y posibles riesgos más estudiados (Silva *et al.*, 2013). Los de alto riesgo pertenecen principalmente al género Alpha-PV cuyas especies más importantes son los que pertenecen a alpha-7 y alpha-9 (Lizano *et al.*, 2009).



En la Tabla 1 se presentan los principales géneros y tipos de VPH y las enfermedades asociadas a estos.

Tabla 1. Resumen de los principales genotipos del VPH, su tropismo y enfermedades asociadas (Harden et al., 2017).

Género	Especies	Tipos representativos de VPH	Tropismo	Enfermedades asociadas
Alpha-PV	$\alpha 1$	32	Mucosa	Enfermedad de Hecks
	$\alpha 2$	3, 10, 28	Cutáneo	Verrugas planas
	$\alpha 4$	2, 27, 57	Cutáneo	Verrugas comunes
	$\alpha 7$	18, 39, 45, 59, 68	Mucosa	Neoplasia intraepitelial, carcinoma invasivo
	$\alpha 9$	16, 31, 33, 35, 52, 58	Mucosa	Neoplasia intraepitelial, carcinoma invasivo
	$\alpha 10$	6, 11	Mucosa	Condilomas acuminados
	-	13	-	Enfermedad de Hecks
Beta-PV	$\beta 1c$	5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 36, 47	Cutáneo	Epidermodisplasia verruciforme
	$\beta 2$	9, 15, 17, 22, 23, 37, 38	Cutáneo	Epidermodisplasia verruciforme
	$\beta 3$	49	Cutáneo	Epidermodisplasia verruciforme
Gamma-PV	$\gamma 1$	4, 65	Cutáneo	Verrugas
	$\gamma 2$	60	Cutáneo	Verrugas
Mu-PV	μ	1	Cutáneo	Verrugas plantares
	μ	63	Cutáneo	Verrugas
Nu-PV	ν	41	Cutáneo	Verrugas

2.3 Estructura viral.

Los virus papiloma humano son virus de tamaño pequeño (52-55 nm), de simetría icosaédrica, no poseen envoltura, su genoma es circular con ADN bicatenario (dsDNA) de aproximadamente 8000 pb que se encuentra asociado a proteínas histonas de la célula huésped (H2a, H2b, H3 y H4), imitando a un complejo parecido a la cromatina (Bernard *et al.*, 2011; Hiller e Iftner, 2004). Consta de una cápside vírica como se observa en la figura 1, conformada por 72 capsómeros, que alberga 360 copias de la proteína principal y más abundante L1, que se agrupa en una conformación pentamérica en cada uno de los capsómeros (Baker *et al.*, 1991). A su vez la cápside contiene 12 copias por virión de la proteína L2 que se encuentra en menor proporción (Figura 1) (Sapp *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2002).

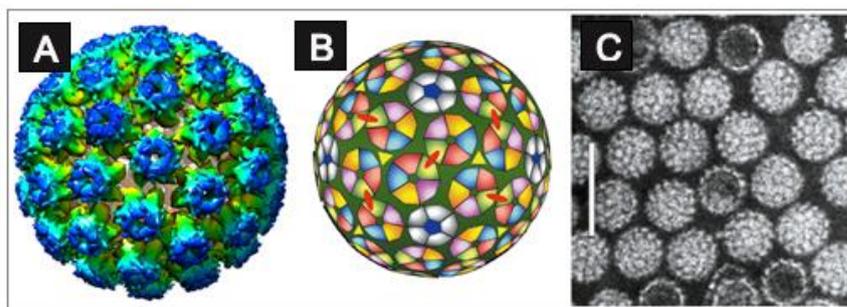


Figura 1. *Papillomavirus*: (A) Representación atómica de una cápside de papilomavirus. (Guan *et al.*, 2017). (B) Diagrama esquemático que representa los 72 capsómeros en una cápside de papilomavirus. (C) Micrografía electrónica de contraste negativo de viriones del virus papiloma humano 1. La barra representa 100 nm. (Imagen obtenida de Van Doorslaer *et al.*, 2018.)

2.4 Genoma viral del VPH:

El genoma del virus papiloma humano posee alrededor de 8 marcos de lectura abierto (ORF), carece de ADN polimerasa, proteasas o enzimas relacionadas con el metabolismo de nucleótidos y se puede organizar en 3 regiones diferentes que se han definido como región temprana, región tardía y otra región denominada reguladora no codificante (Figura 2).

La región temprana (E) está constituida por 6 genes que codifican a las proteínas no estructurales: E1, E2, E4, E5, E6 y E7; éstas son las encargadas de participar durante la replicación viral y oncogénesis. En la región tardía (L) se encuentran los genes que expresan las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2. Por último, la región reguladora o región de control larga (LCR) no codificante se encuentra compuesta por el origen de replicación y secuencias necesarias para el mantenimiento del genoma y promotores de la transcripción (McBride, 2008).

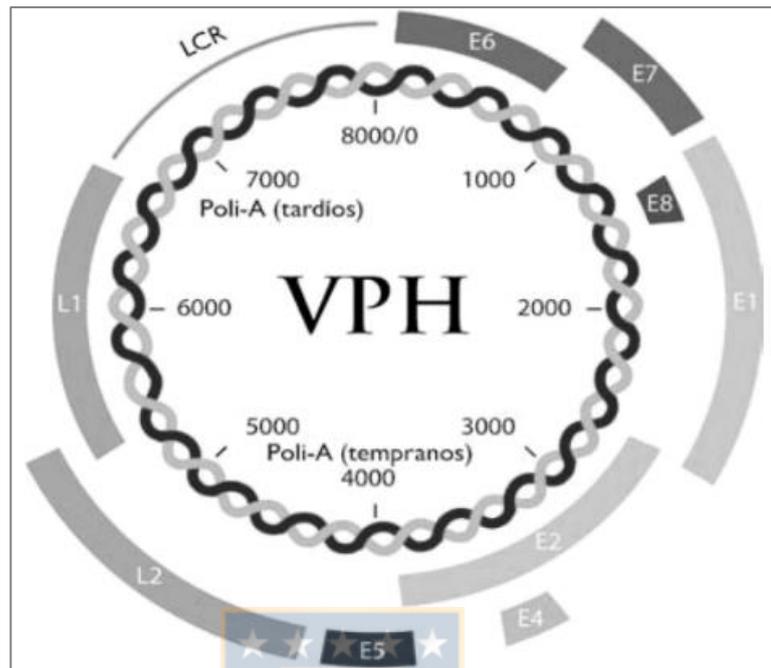


Figura 2. Genoma del VPH (Fuente: Beltrán, 2014).

2.5 Proteínas del VPH.

Las proteínas del VPH se pueden dividir básicamente en dos categorías: estructurales y no estructurales, con distintas funciones asociadas (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas del VPH y funciones asociadas.

Tipo de proteína	Nombre	Funciones o actividades asociadas
No estructurales	E1	Tiene función de ADN helicasa viral, esencial para la replicación y transcripción del cromosoma viral en el núcleo de las células infectadas (Castro <i>et al.</i> , 2019).
	E2	Es la reguladora principal del ciclo de vida viral y participa importantemente en el inicio de la replicación, regulación transcripcional, del ADN y encapsidación del genoma vírico (McBride, 2013).
	E4	Regula los genes tardíos, induce la detención en la fase G2 de la célula huésped, se cree que ayuda en el ensamblaje y salida de viriones. (Doorbar, 2013)
	E5	Induce la proliferación celular no programada (DiMaio y Petti, 2013).
	E6	Actúa principalmente inhibiendo la apoptosis induciendo la degradación de p53, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus. (Mantovani y Banks, 2001).
	E7	Induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y la proliferación viral. (Roman y Munger, 2013)
Estructurales	L1	Proteína estructural viral principal, es altamente inmunogénica, también participa en el ensamblaje de los viriones (Buck, y Day, 2013).
	L2	Proteína estructural viral menor; participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula, su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones (Wang y Roden, 2013).

Además de las proteínas descritas en la tabla anterior, también hay evidencia de que existe la expresión de dos proteínas no estructurales que se encuentran en la región temprana llamadas E3 y E8, pero no se conocen sus funciones actualmente (Modificado de Santos *et al.*, 2015).

2.6 Ciclo de vida del virus papiloma humano de alto riesgo (VPH-ar).

El ciclo de vida corresponde a un proceso no lítico y depende en gran medida de los mecanismos de la célula huésped, así como que ésta se replique activamente (Figura 3) (Egawa, 2003; Schmitt *et al.*, 1996). Comienza con la adhesión a la célula huésped presumiblemente mediante un receptor de heparán sulfato encontrado en la membrana celular de queratinocitos (Giroglou *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999) donde luego de un proceso muy lento se produce la internalización de las partículas virales a través de un fenómeno de endocitosis mediado por vesículas recubiertas de clatrina (Culp y Christensen, 2004; Day *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2002). En el entorno reductor de la célula infectada, se produce la eliminación del revestimiento o descapsidación para que el genoma viral sea transportado al núcleo por un mecanismo aún desconocido (Horvath *et al.*, 2010).

La infección se puede desarrollar primeramente como un proceso latente que puede durar años, donde no se manifiesta el efecto citopático del virus papiloma humano y en el cual hay una producción limitada de partículas virales, manteniendo su ADN de forma episomal con un bajo y constante número partículas de alrededor de 10-200 copias por célula (Middleton *et al.*, 2003). En este punto (capa basal de los queratinocitos) hay una alta expresión de la proteína viral E2, la cual es una proteína encargada de la regulación de la transcripción y la replicación viral que controla negativamente la expresión

de las proteínas E5, E6 y E7, también se encarga de reclutar a E1 que tiene función de helicasa, lo que permite que se produzca la replicación y se facilite la correcta segregación vírica en las células hijas manteniendo el genoma viral episomal (Longworth *et al.*, 2004).

A medida que avanza la diferenciación celular a capas suprabasales ocurre un proceso contrario al latente denominado productivo, donde disminuye la expresión de E2 debido a que el sitio ORF de E2 se encuentra interrumpido cuando el genoma vírico se integra al ADN de la célula huésped, por lo que el reclutamiento de E1 ya no es suficiente para la mantención del genoma episomal. También se expresa E5 que además de estimular la actividad de las proteínas virales E6 y E7, promueve la fusión del genoma vírico al de la célula comensal; estando integrado y con la baja cantidad de la proteína viral E2, se produce una sobreexpresión de las proteínas E7 y E6, éstas se pueden asociar a funciones reguladoras del ciclo celular, teniendo como característica principal la proliferación celular suprimiendo entonces la restricción del ciclo celular manteniéndolo en un estado pseudo-S a la célula infectada, ya que E7 se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB (proteína del retinoblastoma). E6 de manera similar se puede unir a otra proteína supresora de tumores, llamada p53, degradándola con el fin de inmortalizar a la célula infectada impidiendo que se cumpla el proceso de muerte celular por apoptosis y acumulando daño celular por replicación no controlada (White *et al.*, 2012, Brimer *et al.*, 2017).

Finalmente, en las capas epiteliales superiores, mediante la expresión de las proteínas estructurales L1 y L2, se procede a empaquetar las partículas virales ensambladas con anterioridad con la ayuda de E4, que mejora el proceso de formación de los capsómeros y mediante un proceso de descamación natural son liberados los viriones completos sin lisis la célula (Horvath *et al.*, 2010, Chow *et al.*, 2010).

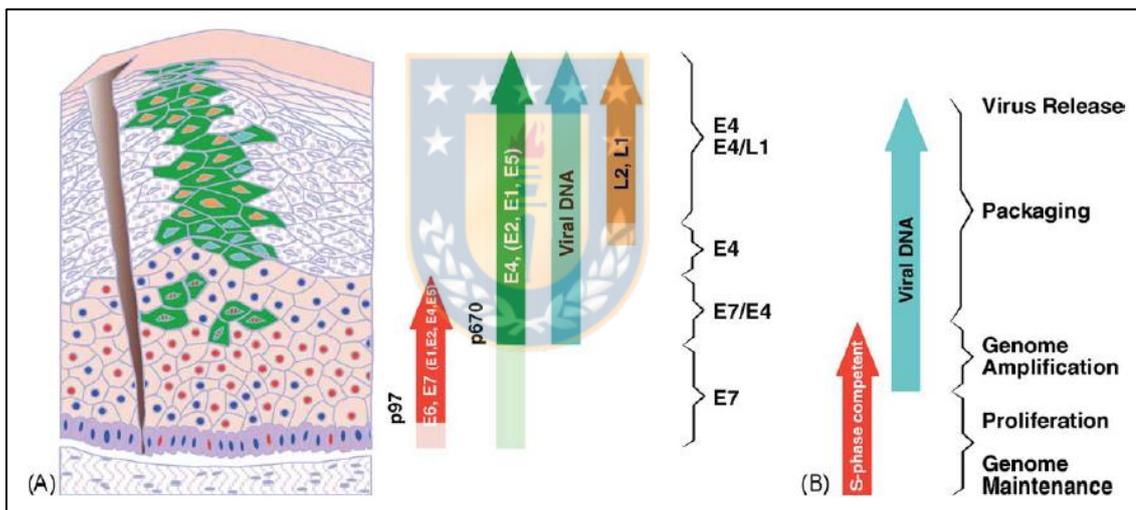


Figura 3. Ciclo de vida del VPH: (a) esquema del ciclo de vida productivo del VPH, a medida que la célula madre comienza a diferenciarse desde la capa basal, pasando por la capa suprabasal hasta llegar a la superficial y la expresión de las respectivas proteínas de acuerdo al grado de diferenciación celular y los principales promotores asociados a su expresión. (b) etapas generales del ciclo de vida productivo tras la infección por el virus papiloma humano. (modificado de Doorbar, 2005).

2.7 Epidemiología del VPH-ar y la asociación con el CCU.

Los VPH-ar tienen una incidencia mayor que los VPH de bajo riesgo o no oncogénicos (Franco *et al.*, 1999, Giuliano *et al.*, 2002, Ho *et al.*, 1998), principalmente se transmiten por vía sexual y corresponden a una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más comunes y frecuentes a nivel mundial. Se presume que la primoinfección por este virus se da con el inicio de las relaciones sexuales, además se ve potenciada por algunos factores como la edad en que se inicie la vida sexual y el número de parejas sexuales (Burk *et al.*, 1996).



Los genotipos de alto riesgo se distribuyen de forma heterogénea globalmente, pero más comúnmente se encuentran los genotipos VPH 16 (Richardson *et al.*, 2003; Schiffman, 1992; Woodman *et al.*, 2001) y VPH 18, con un 53% y un 15%, respectivamente. El porcentaje restante se encuentra asociado a un grupo de aproximadamente 12 genotipos que van desde posible/probable riesgo hasta otros con clasificación de alto riesgo oncogénico donde destacan HPV 45 con 9%, HPV 31 con 6% y HPV 33 con un 3%.

Sin bien este tipo de infección normalmente es autocontrolada con un tiempo de duración promedio de alrededor de 12 meses (Rodríguez, *et al.*, 2008), en alrededor del 10% de la población total infectada se llega a producir una infección persistente a través del tiempo, ocasionando diferentes patologías donde el mayor interés clínico, en la población femenina, es el cáncer cérvico

uterino debido a que se ha reportado que es el responsable de casi el 90% de este tipo de cáncer. (Walboomers *et al*, 1999).

Según datos de GLOBOCAN (Observatorio Global del Cáncer), el cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más prevalente entre las mujeres de todo el mundo y es de particular importancia, ya que en 2018 produjo un total de 311.365 muertes y 569.847 nuevos casos en el mundo, mientras que en Chile hubo 13.463 muertes y 1.549 nuevos casos (Bray *et al.*, 2018).

Aunque el cáncer de cérvix ha sido el más documentado, la infección por VPH de alto riesgo cancerígeno en otras zonas anogenitales puede producir diversos carcinomas, tales como: cáncer vaginal (Daling *et al.*, 2002), vulvar (Trimble *et al.*, 1996), de pene (Rubin *et al.*, 2001) y anal (Clark *et al.*, 2004).

2.8 Patogenia de los VPH-ar.

La transmisión principal se basa en el contacto piel a piel, se plantea que en el sitio donde se produzca la infección deben existir rupturas del epitelio basal o micro-traumas para que pueda adherirse. Sin embargo, aún hay mucha controversia por el mecanismo en sí, ya que la replicación del VPH no ha tenido éxito en cultivos estándares, debido a la dificultad de representar un epitelio estratificado *in vitro*, pero se ha sugerido que el receptor asociado a

esta unión es el proteoglicano heparán sulfato (PHS) (Giroglou *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999).

La gran mayoría de los VPH-ar oncogénicos que infectan las mucosas humanas son los Alpha-PV. Si bien una infección incidente es insuficiente para el desarrollo de malignidad, debido a que pueden remitir en promedio dentro de un año (Insinga, *et al.*, 2009; Brianti *et al.*, 2017), se ha visto principalmente en el epitelio cervical que la infección persistente es uno de los factores principales de riesgo para la progresión hacia un proceso carcinogénico como el cáncer cérvico uterino (Burk *et al.*, 2009). Generalmente el 90% de las infecciones son subclínicas, pero las que progresan son capaces de producir diversos cánceres, que además de cuello uterino también tienen alta incidencia anal, vulvar, de vagina, entre otros. (Reid *et al.*, 1982).

El mecanismo esencial para que un contagio persistente por algún genotipo de alto riesgo oncogénico desencadene patologías clínicas, además de infectar necesariamente zonas con micro traumas y de transición epitelial, es que las células posean una alta capacidad de proliferar como las encontradas en las capas basales de queratinocitos; de esta manera el virus induce una estimulación exagerada de proteínas encargadas de la proliferación celular, sin importar el daño genético que se vaya acumulando y que pueda conducir a lesiones cancerosas (Kessis *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1991). La estimulación nombrada con anterioridad está a cargo de las proteínas

oncogénicas E7 y E6, las cuales una vez que se ha integrado el genoma del VPH de alto riesgo con el ADN de la célula infectada ya no se encontrarán inhibidas por la proteína E2 (se inactiva su expresión) y, por ende, se produce la sobreexpresión de E7 y E6 (Jeon *et al.*, 1995).

Se sabe que E6 es capaz de activar a la telomerasa y de este modo estabilizar los telómeros, impidiendo su acortamiento como sucede típicamente tras cada ciclo celular, lo que dificulta que alcancen el punto crítico donde se activan mecanismos de muerte celular. Además, esta proteína tiene la capacidad de unirse e inducir la ubiquitinación de la proteína pro-apoptótica por excelencia llamada p53, degradándola y produciendo así la disminución de la apoptosis mediada por p53 (Werness y Howley, 1990; Thomas *et al.*, 1999). Por otro lado, E7, es capaz de unirse a la proteína del retinoblastoma o pRB, lo que libera el factor de transcripción E2F, ésto permite que la célula entre en un estado S donde ocurre una alta transcripción de genes encargados de la proliferación celular y síntesis descontrolada de ADN celular (Figura 4) (Dyson *et al.*, 1989).

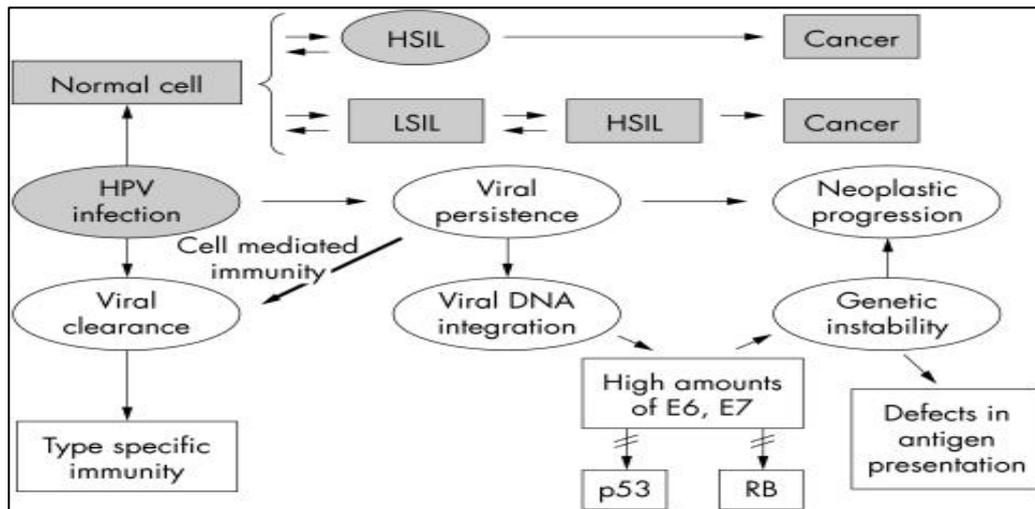


Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis del virus papiloma humano (VPH). HSIL, lesión intraepitelial escamosa de alto grado. LSIL, lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. RB: gen del retinoblastoma. p53: Proteína supresora de tumores. (Modificado de Bosch *et al.*, 2002).



2.9 Clínica del VPH-ar y su relación con el CCU.

La sintomatología producida por los VPH normalmente tiene un carácter subclínico, y en casos donde existe una infección productiva y persistente por VPH podría desencadenar diferentes patologías clínicas dependiendo de la zona donde se produzca el contagio y del genotipo asociado.

En el caso de los VPH de alto riesgo mucosotrópicos transmitidos de manera sexual, pueden conducir a patologías de carácter oncogénico importantes donde se le ha dado la mayor relevancia al cáncer cérvico uterino al ser el de mayor incidencia, ya que generalmente los otros tipos de cáncer asociados al

área anogenital son muy raros con una tasa de 1 por cada 100.000 habitantes (Bleeker *et al*, 2003). El CCU se subdivide en dos tipos histológicos principales de cáncer invasivo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuales son:

- Carcinoma de células escamosas (CCE): Este tipo de cáncer constituye alrededor del 75% de todos los casos descritos, se subdividen en queratinizados y no queratinizados. En el primer caso hay presencia de grandes células tumorales bien diferenciadas o medianamente; los no queratinizados están pobremente diferenciados y pueden ser de tipo de células grandes o pequeñas.
- Adenocarcinoma: Constituye entre el 15-25% de todos los casos aproximadamente. Son menos frecuentes que los CCE y es posible encontrar dos o más formas histológicas de adenocarcinoma en el mismo tumor. Generalmente son más difíciles de detectar por inspección visual del cérvix.

También, pero en muy baja proporción, se podrían encontrar el carcinoma adenoescamoso, carcinoma adenoide quístico y carcinoma metastásico, los cuales constituyen el restante 3-5% de casos (Jhingran, 2008).

2.10 Diagnóstico de genotipos virales de VPH-ar.

Si bien es mundialmente conocida la prueba de Papanicolaou por ser usada para detectar células anormales en el cérvix, esta técnica comprende limitaciones importantes, ya que no permite detectar lesiones precancerosas y es importante complementarla, por ejemplo, con algunas técnicas diseñadas de forma puntual para la detección de VPH-ar, que se sabe está fuertemente vinculado con patologías cancerígenas sobre todo del tracto anogenital. Estas técnicas difieren en especificidad y sensibilidad, así como su complejidad de implementación. Algunas de las más usadas son Cobas® 4800 HPV Test y la Prueba de Captura Híbridos 2, ya que estas técnicas son capaces de diferenciar entre genotipos y carga viral (Cox et al., 1995):

- Captura de Híbridos 2 (HC2): Es la prueba más antigua y más frecuentemente usada a nivel mundial. Se trata de un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos mediante amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca, para la detección cualitativa del ADN de 12 tipos de VPH-ar (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), más el HPV- 68 encontrado en muestras cérvico uterinas, de modo que permite la formación de un híbrido entre el ADN viral (muestra) - ARN sonda, que es reconocido por un anticuerpo monoclonal específico conjugado con fosfatasa alcalina. Sin embargo, la detección es semicuantitativa.

- Cobas® 4800 HPV Test: técnica implementada en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano, que permite detectar 14 tipos de HPV-ar de manera cualitativa y con alta sensibilidad y especificidad. Entre los VPH-ar que logra detectar se encuentran el HPV 16 y HPV 18, además de 12 VPH –ar agrupados (HPV31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 y -68) y beta-globina que se usa como control interno de celularidad en cada muestra. Tiene la ventaja de ser completamente automatizado para la realización de una qPCR capaz de amplificar un fragmento de gen viral L1 de aproximadamente 200 pb.



2.11 Vacunas contra el VPH-ar.

En la actualidad están disponibles dos vacunas exclusivamente profilácticas para el virus papiloma humano, una bivalente para los genotipos 16-18 y otra cuadrivalente para los genotipos 6-11-16 y 18. Ambas han demostrado ser eficaces aumentando la respuesta inmune 10 veces más que de manera natural. La eficacia para prevenir infecciones y lesiones cervicales se ha evidenciado en más del 90%.

En Chile se recomienda la vacunación en edad escolar aplicando la vacuna cuadrivalente comercialmente conocida como GARDASIL, la primera dosis de esta vacuna se aplica preferentemente a la edad de 11-12 años y una segunda dosis un año después (MINSAL).

3. PROBLEMA.

La infección persistente por VPH de alto riesgo es considerada la causa principal de cáncer cérvico uterino con una alta tasa de mortalidad en mujeres a nivel mundial, generando un alto costo tanto en la salud pública como personal y, por ende, se necesita implementar una técnica que permita la detección precoz de este virus en muestras de células cervicales.



4. PREGUNTA.

¿Cómo implementar la técnica de PCR en tiempo real en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano para la detección de los VPH de alto riesgo en muestras de células cervicales?

5. HIPÓTESIS.

La implementación de la técnica de PCR en tiempo real en el equipo Cobas 4800, permite la detección de los VPH de alto riesgo en muestras que contienen células cervicales.

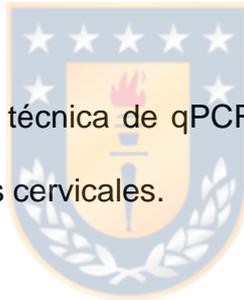
6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Implementar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de VPH-ar en muestras de células cervicales.

6.2 Objetivos específicos.

- Implementación de la técnica de qPCR para la detección de VPH-ar en muestras de citologías cervicales.
- Confección de un protocolo para la detección de VPH-ar en el equipo Cobas 4800.



7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se estudiaron muestras con células de cérvix utilizando el equipo automatizado Cobas 4800 y empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o qPCR para la detección molecular específica de la región L1 de los VPH de alto riesgo.

7.1 Diseño del estudio.

Se realizó un estudio de corte transversal. Para ello se analizaron muestras que contenían células cervicales, recolectadas durante el período comprendido entre octubre de 2019 hasta principios de abril de 2020. Las muestras fueron facilitadas por distintos centros de salud primaria de la Provincia de Concepción.

7.2 Criterios de inclusión y exclusión del estudio.

Se procesó la totalidad de muestras recibidas en la sección de Biología Molecular. Sin embargo, según criterios de la guía del MINSAL para CCU y del “Programa de cáncer de cuello uterino: VPH realizados e informados según resultados y grupos de edad”, solo se utilizaron las muestras de

mujeres cuyas edades fueran mayor o igual a 30 años. Además, se consideró que la prueba del VPH no debía corresponder a:

- Mujeres sometidas a una histerectomía.
- Utilización de muestras recolectadas de manera distinta, ya sea porque el médico usara un cepillo/espátula endocervical o fuera colocada en una solución de transporte distinta a PreservCyt®.

7.3 Equipos y materiales.



7.3.1 Reactivos.

- Partículas de vidrio magnéticas (Cobas® 4800 System MGP).
- Buffer de elución (Cobas® 4800 System EB).
- Buffer de lavado (Cobas® 4800 System WB).
- Proteínasa K (Cobas® 4800 PK).
- SDS (Cobas® 4800 System SDS Reagent).
- Buffer de lisis (Cobas® 4800 System LYS).
- Master MIX (Cobas® 4800 HPV MMX).
- Solución de Mg/Mn (HPV Mg/Mn).
- Control positivo para VPH (Cobas® 4800 HPV (+) control).
- Control negativo para VPH (Cobas® 4800 System (-) Control).

7.3.2 Instrumentación y software.

- Equipo Cobas x 480
- Analizador Cobas z 480
- Unidad de control del sistema Cobas 4800 con software del sistema versión 2.1 o superior.
- Cobas ® Sistema 4800 cobas ® Software HPV AP versión 2.0.1 o superior.
- Placa magnética independiente (P/N: 05440777001).
- Etiquetas de códigos de barras resistentes al calor.
- Termómetro -20 / 150°C.
- Bloque calefactor digital de 120 V.
- Módulo de bloque térmico de 12 orificios de 16 mm.



7.3.3 Materiales extras requeridos pero no suministrados.

- Cobas ® Sample Prep Buffer (Buffer que contiene un detergente).
- Rack de 96 Puntas o CORE Tips de 1000 µL.
- Gradilla de 96 pocillos.
- Depósito de reactivo de 50 mL.
- Depósito de reactivo de 200 mL.
- Placa de extracción del sistema 4800 (placa de pozo profundo) 1,6 mL.
- Placa de 96 micropocillos y película de sellado para Cobas 4800.
- Soporte para muestras en gradilla, SMP-CAR-12-D35, PreservCyt.
- Bolsa para residuos biológicos.
- Conducto de plástico Hamilton STAR.
- Mezclador vórtex.

- Guantes desechables sin polvo.
- Pipetas: capaces de suministrar 1000 μ L.
- Puntas sin ADNasa con barrera de aerosol: capaces de suministrar 1000 μ L.

7.4. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.

7.4.1 Recolección de especímenes.

Las muestras del estudio fueron recolectadas previamente por un profesional capacitado. La recolección se efectuó con la ayuda de un cepillo o espátula endocervical, fueron preservadas en un medio de transporte PreservCyt® y, posteriormente, enviadas a la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Las Higueras de Talcahuano. Las muestras se ingresaron y rotularon con un código de barras único para cada una de las muestras y, luego se derivaron a la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio Clínico ubicado en el mismo recinto.

7.4.2 Transporte de muestras.

Las muestras de cuello uterino fueron transportadas a una temperatura entre 2-30°C cumpliendo las normativas nacionales para el transporte de agentes infecciosos del ISP.

7.4.3 Almacenamiento de muestras.

Las muestras sólo se pueden almacenar a una temperatura de 2 a 30°C por un período máximo de 6 meses posterior a la fecha de recolección y no deben congelarse.

7.5 Aplicación de la técnica de qPCR en el equipo Cobas 4800.

7.5.1 Cantidad de muestras y número de pruebas por kits.

El sistema del equipo Cobas 4800 para la prueba de VPH soporta cargas de 1 a 94 muestras además del control positivo y negativo (hasta 96 muestras por corrida), de modo que se debe optimizar los recursos empleados y tratar de ejecutar la máxima cantidad de muestras soportadas.

Cada uno de los kits de preparación de muestras posee reactivos suficientes para 96 pruebas (960 pruebas por kit) al igual que el kit de amplificación/detección de VPH, mientras que el kit de controles de VPH contiene suficientes reactivos para un total de 10 experimentos (10 juegos por kit).

7.5.2 Extracción automatizada y simultánea del material genético de las muestras para la prueba de VPH.

La extracción del ADN celular de las muestras de células cervicales así como el material genómico del virus papiloma humano de alto riesgo que pudiesen haber infectado estas muestras se realizó en el equipo Cobas x 480 como se observa en la Figura 5. Este procedimiento es automatizado y consistió en la digestión de las células de cervix en condiciones de desnaturalización a temperaturas elevadas para luego ser lisadas en presencia de un agente caotrópico. Los ácidos nucleicos que fueron liberados se purificaron mediante adsorción a partículas de vidrio magnéticas (PMG), se lavaron y posteriormente fueron separadas de estas PMG; una vez que se realizó el proceso mencionado anteriormente, se procedió a la amplificación y detección por qPCR.

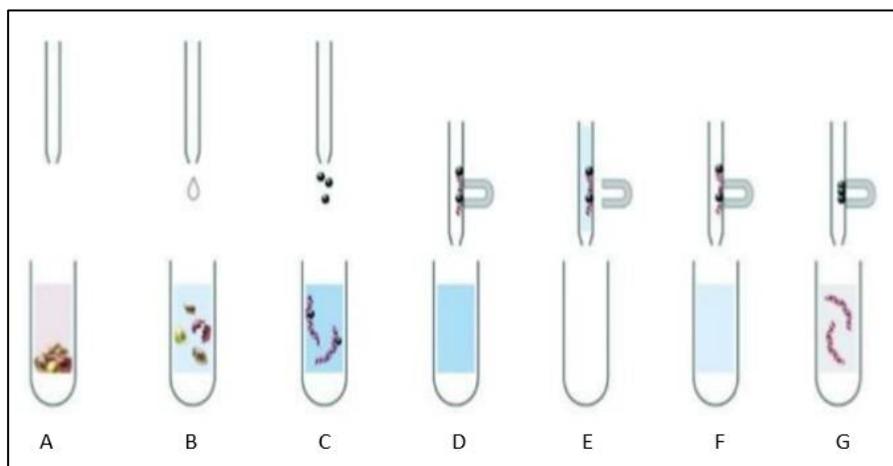


Figura 5. Aislamiento de ácidos nucleicos utilizando partículas de vidrio magnéticas. A) Material de muestra. B) Disrupción celular y digestión proteica mediante la adición de Buffer de Lisis y Proteinasas K. C) Unión de ácido nucleico a la superficie de partículas de vidrio magnéticas. D)

Separación magnética del complejo ácido nucleico-PMG. E) Eliminación de residuos celulares mediante extensos pasos de lavado. F) Separación magnética del complejo ácido nucleico- PMG. G) Elución de ácido nucleico a altas temperaturas durante la eliminación de las partículas magnéticas de vidrio. (Roche Molecular Systems 2018c).

7.5.3 Amplificación y detección por qPCR de VPH-ar y β -globina.

La amplificación y detección del ADN genómico se realizó en el Analizador Cobas z 480. Se utilizaron primers de 200 nucleótidos definidos dentro de la región polimórfica L1 del genoma del VPH y otro par de primers de 330 nucleótidos para β -globina. También se emplearon sondas Taqman con un marcador fluorescente (indicador) y un quencher. A medida que se produjo la amplificación, las sondas complementarias al amplicón se unieron a secuencias específicas de ADN monocatenario y fueron escindidas por la actividad nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa EagleZ05. Cuando el indicador se separó del inhibidor se emitió una señal de fluorescencia de longitud de onda característica al excitarse con el espectro de luz adecuado. Esto permite la detección por separado de los amplicones de VPH 16, VPH 18, 12 genotipos de alto riesgo agrupados y el control de la beta-globina, puesto que las sondas específicas para estas secuencias están marcadas con diferentes colores.

Los pasos para la amplificación fueron:

- Desnaturalizar el ADN viral y el ADN genómico para exponer las secuencias diana del cebador.
- A medida que la mezcla se enfría, los cebadores aguas arriba y aguas abajo se aparean con las secuencias de ADN diana.
- La ADN polimerasa EagleZ05, en presencia de iones metálicos divalentes y dNTP en exceso, extiende los cebadores y se sintetiza una segunda hebra de ADN completándose el primer ciclo de PCR, tras esto se produce una copia de ADN bicatenario de la región diana del genoma del VPH y del gen de la β - globina. Este proceso se repite durante varios ciclos y amplificando solo en la región del genoma del VPH y/o de la β - globina entre el par de cebadores apropiado.
- Además se reduce el riesgo de contaminación en la amplificación mediante el uso de una enzima AmpErase (Uracil-N-glicosilasa) que es capaz de reconocer y destruir las hebras de ADN que contuvieran desoxiuridina antes de la amplificación del ADN diana. La enzima AmpErase se inactiva a temperaturas superiores a 55°C, es decir, a lo largo del ciclo térmico y, por lo tanto, no destruye el amplicón objetivo.

7.5.4 Procesamiento completo de las muestras para detección de VPH-ar.

El flujo de trabajo completo para la detección del VPH se resume en la Figura 6. Se inicia con la extracción de muestras de ADN genómico en el instrumento Cobas x 480 seguido de la amplificación y detección en el analizador Cobas z 480 y cuyos resultados se interpretan como se indica en la Tabla 3 para luego ser enviados al Sistema Interno de Laboratorio (LIS). El procesamiento de muestras paso a paso se explica en el anexo 1 al final de este documento.

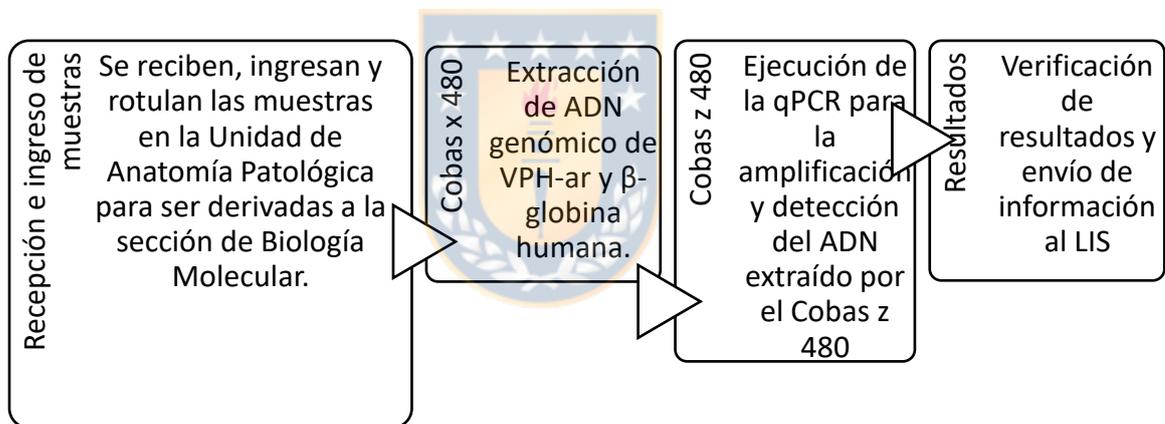


Figura 6. Esquema del procesamiento de muestras de cuello uterino para la detección de VPH-ar

Tabla 3. Informe de resultados e interpretación para la prueba de VPH-ar mediante el equipo Cobas 4800.

Prueba de VPH Cobas 4800	Informe de resultado.	Informe de interpretación.
POS otros VPH-ar	Otro VPH-ar positivo	La muestra es positiva para el ADN de cualquiera de, o una combinación de, los siguientes VPH-ar: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.
NEG Otros VPH-ar	Otro VPH-ar negativo *	El ADN de los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 del VPH eran indetectables o estaban por debajo del umbral preestablecido.
POS VPH 16	VPH16 positivo	La muestra es positiva para el ADN del VPH 16.
Negativo VPH 16	VPH16 negativo *	El ADN del VPH 16 era indetectable o estaba por debajo del umbral preestablecido.
POS VPH 18	HPV18 positivo	La muestra es positiva para el ADN del VPH 18.
NEG VPH 18	VPH18 negativo *	El ADN del VPH 18 era indetectable o estaba por debajo del umbral preestablecido.
REPETIR MUESTRA	Ningún resultado para la muestra	La muestra original debe volver a analizarse para obtener resultados válidos. Si los resultados aún no son válidos, se debe obtener una nueva muestra. Esto se realiza cuando el control de β -globina para la muestra no es válido o si existen interferentes que no permitan procesar la muestra correctamente.
* Un resultado negativo no excluye la presencia de infección por VPH porque los resultados dependen de la recolección adecuada de muestras, la ausencia de inhibidores y suficiente celularidad definido con el control de β -globina.		

8. RESULTADOS.

8.1 Detección y genotipificación de los VPH-ar mediante la técnica de PCR en tiempo real en el equipo automatizado Cobas 4800.

Se analizó un total de 4.323 muestras, de las cuales 84 se excluyeron por estar fuera del rango etario recomendado por las guías clínicas del MINSAL y del “PROGRAMA DE CUELLO UTERINO: VPH REALIZADOS E INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS Y GRUPO DE EDAD” al ser mujeres menores de 30 años.



Los resultados de cada mes (octubre de 2019 a abril de 2020) se presentan de la tabla 4 a la tabla 10, mientras que en la tabla 11 se resumen los resultados de todos los meses que duró el estudio. En cada una se puede observar la positividad dependiendo del genotipo detectado, también si en la muestra se detectó el ADN genómico de uno o más de estos genotipos y la categorización de acuerdo al rango etario. Además, se informó como NM la solicitud de nueva muestra y la cantidad de muestras rechazadas.

Tabla 4. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	92	75	4	1	12	0	1
35 a 39	80	64	3	0	13	0	2
40 a 44	55	49	1	0	5	1	0
45 a 49	76	68	2	0	6	1	1
50 a 54	73	66	2	1	4	1	2
55 a 59	72	65	2	0	5	0	0
60 a 64	51	46	0	0	5	1	0
65 a 69	2	2	0	0	0	0	0
70 a 74	0	0	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	501	435	14	2	50	4	6
Total muestras procesadas	520	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

Tabla 5. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha noviembre de 2019.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	72	54	2	1	15	0	1
35 a 39	63	52	1	2	8	2	0
40 a 44	75	66	3	0	6	0	2
45 a 49	65	61	0	0	4	0	0
50 a 54	67	62	1	0	4	0	0
55 a 59	91	80	2	0	9	0	1
60 a 64	56	52	0	0	4	0	0
65 a 69	2	2	0	0	0	0	0
70 a 74	1	1	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	492	430	9	3	50	2	4
Total muestras procesadas	504	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

Tabla 6. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha diciembre de 2019.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	140	114	6	1	19	3	1
35 a 39	147	115	8	3	21	0	4
40 a 44	131	123	3	0	7	2	1
45 a 49	148	137	3	1	7	2	0
50 a 54	169	151	3	2	13	1	1
55 a 59	180	166	1	0	13	0	1
60 a 64	128	116	1	0	11	0	0
65 a 69	1	1	0	0	0	0	0
70 a 74	0	0	0	0	0	0	0
75 a 79	1	1	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1045	924	25	7	91	8	8
Total muestras procesadas		1072	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra				

Tabla 7. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha enero de 2020.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	128	99	8	2	19	0	7
35 a 39	109	88	4	0	17	1	0
40 a 44	104	88	1	1	14	0	1
45 a 49	112	98	4	2	8	3	1
50 a 54	114	102	2	0	10	2	0
55 a 59	139	124	2	0	13	1	1
60 a 64	104	95	2	0	7	3	0
65 a 69	21	21	0	0	0	1	0
70 a 74	2	2	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	833	717	23	5	88	11	10
Total muestras procesadas	855	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

Tabla 8. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha febrero de 2020.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	83	67	3	0	13	0	1
35 a 39	82	70	2	1	9	1	2
40 a 44	65	58	0	1	6	2	0
45 a 49	80	65	4	3	8	1	1
50 a 54	101	89	1	1	10	0	1
55 a 59	91	85	0	1	5	2	1
60 a 64	57	52	0	1	4	1	1
65 a 69	7	6	1	0	0	0	0
70 a 74	0	0	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	566	492	11	8	55	7	7
Total muestras procesadas	579	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

Tabla 9. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha marzo de 2020.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	104	78	4	0	22	0	3
35 a 39	101	86	2	1	12	2	3
40 a 44	103	88	5	0	10	2	0
45 a 49	113	91	4	3	15	1	4
50 a 54	118	104	3	3	8	1	3
55 a 59	108	100	1	1	6	2	1
60 a 64	75	68	1	2	4	1	1
65 a 69	6	5	0	0	1	0	0
70 a 74	1	1	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	729	621	20	10	78	9	15
Total muestras procesadas	758	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

Tabla 10. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha abril de 2020.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	9	9	0	0	0	0	0
35 a 39	5	5	0	0	0	0	0
40 a 44	4	4	0	0	0	0	0
45 a 49	6	6	0	0	0	0	0
50 a 54	5	5	0	0	0	0	0
55 a 59	2	2	0	0	0	0	0
60 a 64	3	3	0	0	0	0	0
65 a 69	0	0	0	0	0	0	0
70 a 74	0	0	0	0	0	0	0
75 a 79	0	0	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	34	34	0	0	0	0	0
Total muestras procesadas	37		Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra				

Tabla 11. Exámenes de VPH clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.

Grupos etarios (años)	VPH INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS						
	Total	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	NM	Más de 1 VPH (+)
30 a 34	628	496	27	5	100	3	14
35 a 39	587	480	20	7	80	6	11
40 a 44	537	476	13	2	48	7	4
45 a 49	600	526	17	9	48	8	7
50 a 54	647	579	12	7	49	5	7
55 a 59	683	622	8	2	51	5	5
60 a 64	474	432	4	3	35	6	2
65 a 69	39	37	1	0	1	1	0
70 a 74	4	4	0	0	0	0	0
75 a 79	1	1	0	0	0	0	0
80 y más	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	4202	3653	102	35	412	41	50
Total muestras procesadas	4323	Nota: El total no considera a las pacientes entre 25 y 29 años NM: Nueva muestra					

En las tablas que se presentan a continuación se agruparon los rangos etarios superiores a 60 años por la baja cantidad de muestras que se obtuvieron y que estos datos no afecten las estadísticas que se desarrollaron más adelante.

Tabla 12. Exámenes de VPH positivos y negativos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.

Grupo etario (años)	VPH (-)	VPH-ar (+)	Total muestras
30 a 34	496	132	628
35 a 39	480	107	587
40 a 44	476	63	539
45 a 49	526	74	600
50 a 54	579	68	647
55 a 59	622	61	683
60 y más	474	44	518
Total	3653	549	4202

De los resultados presentados en la tabla 12, se observa que de las 4.202 muestras analizadas, 3.653 (86,93%) se informaron con un resultado de VPH (-) para los genotipos de VPH-ar evaluados, y el total de las muestras informadas como VPH-ar (+) fue de 549 (13,07%).

Tabla 13. Exámenes de VPH-ar positivos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.

Grupo etario (años)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)
30 a 34	27	5	100
35 a 39	20	7	80
40 a 44	13	2	48
45 a 49	17	9	48
50 a 54	12	7	49
55 a 59	8	2	51
60 y más	5	3	36
Total	102 (19%)	35 (6%)	412 (75%)

En la tabla 13 se observa para cada rango etario, los resultados de VPH según positividad en 3 categorías diferenciadas: VPH 16, VPH 18 Y VPH AR*. Además, se deduce que de las 4.202 muestras analizadas, 102 (19%) muestras fueron positivas para VPH 16, 35 (6%) para VPH 18 y 412 (75%) muestras fueron positivas para VPH-ar agrupados (Figura 7).

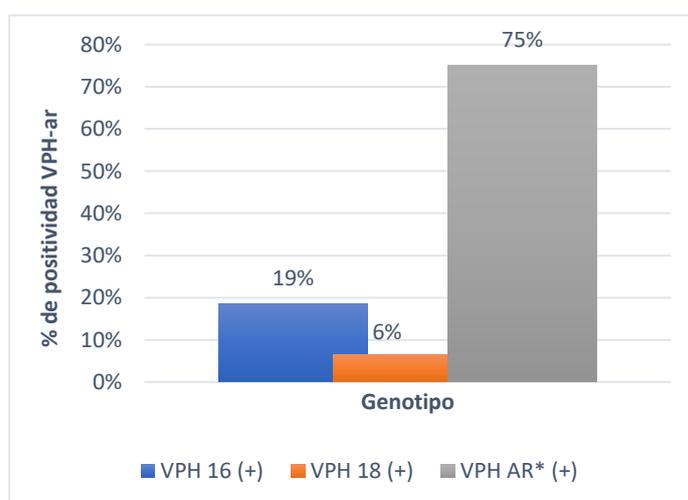


Figura 7. Porcentaje de positividad para los distintos genotipos de VPH de alto riesgo evaluados.

Tabla 14. Porcentajes de exámenes de VPH-ar positivos clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes e informados con fecha octubre de 2019 a abril de 2020.

Grupo etario (años)	% VPH (-)	% VPH-ar (+)
30 a 34	79%	21%
35 a 39	82%	18%
40 a 44	88%	12%
45 a 49	88%	12%
50 a 54	89%	11%
55 a 59	91%	9%
60 y más	92%	8%
Total	87%	13%

En la tabla 14 se presenta la distribución en porcentajes de la cantidad de exámenes VPH (-) y VPH (+) según el rango etario, encontrándose en los primeros dos rangos una mayor proporción de VPH (+) (21% entre 30-34 años y 18% para 35-39 años) mientras que en los demás rangos en promedio se presentó un 10%. El total de los exámenes VPH (-) detectados fue de un 87% mientras que los resultados con VPH-ar (+) fue de un 13%, en el total de las 4.202 muestras analizadas.

Tabla 15. Rango etario y coinfecciones por detección de más de un genotipo de VPH-ar.

Grupo etario (años)	VPH 16 / VPH AR*	VPH 18 / VPH AR*	VPH 16 / VPH 18 / VPH AR*	Total
30 a 34	12	2	0	14
35 a 39	10	1	0	11
40 a 44	4	0	0	4
45 a 49	5	2	0	7
50 a 54	3	3	1	7
55 a 59	3	1	1	5
60 y más	0	1	1	2
Total	37	10	3	50

En el análisis presentado en la tabla 15, la distribución de coinfecciones por detección de más de un genotipo de VPH-ar respecto al rango etario, mostró que el mayor número fue para VPH 16/VPH AR* con 37 coinfecciones, seguido por VPH 18/VPH AR* con 10 y para VPH 16/VPH 18 y VPH AR* un total de 3 resultados, lo que suma un total de 50 exámenes positivos para más de 1 genotipo de VPH-ar.

Para analizar si la infección por VPH era dependiente de la edad de la paciente, se realizó una prueba estadística de X^2 de Pearson, para lo cual se planteó una Hipótesis nula o H_0 y una Hipótesis alternativa o H_a .

H_0 : El grupo etario y la prevalencia de la infección por VPH-ar son independientes. H_a : El grupo etario y la prevalencia de la infección por VPH-ar son dependientes.

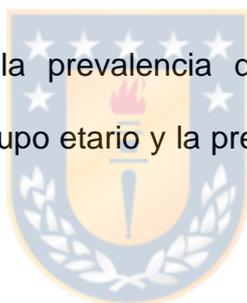


Tabla 16. Valores observados de los exámenes negativos y positivos de VPH-ar clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes.

Grupo etario (años)	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	Total
30 a 34	496	27	5	100	628
35 a 39	480	20	7	80	587
40 a 44	476	13	2	48	539
45 a 49	526	17	9	48	600
50 a 54	579	12	7	49	647
55 a 59	622	8	2	51	683
60 y más	474	5	3	36	518
Total	3653	102	35	412	4202

Tabla 17. Porcentaje de distribución para cada genotipo de VPH-ar clasificados de acuerdo a la edad de los pacientes.

Grupo etario (años)	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	Total
30 a 34	14%	26%	14%	24%	15%
35 a 39	13%	20%	20%	19%	14%
40 a 44	13%	13%	6%	12%	13%
45 a 49	14%	17%	26%	12%	14%
50 a 54	16%	12%	20%	12%	15%
55 a 59	17%	8%	6%	12%	16%
60 y más	13%	5%	9%	9%	12%

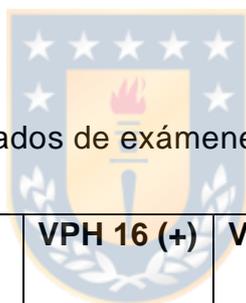


Tabla 18. Valores esperados de exámenes positivos para VPH-ar para un total de 4.202 muestras.

Grupo etario (años)	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	Total
30 a 34	545,95	15,24	5,23	61,57	628
35 a 39	510,31	14,25	4,89	57,55	587
40 a 44	468,58	13,08	4,49	52,85	537
45 a 49	521,61	14,56	5,00	58,83	600
50 a 54	562,47	15,71	5,39	63,44	647
55 a 59	593,76	16,58	5,69	66,97	683
60 y más	450,32	12,57	4,31	50,79	518
Total	3653	102	35	412	4202

Tabla 19. Prueba de X^2 de Pearson con 18 grados de libertad y un nivel de significancia de 5%.

Grupo etario (años)	VPH (-)	VPH 16 (+)	VPH 18 (+)	VPH AR* (+)	Total
30 a 34	4,57	9,07	0,01	23,98	37,63
35 a 39	1,80	2,32	0,91	8,75	13,79
40 a 44	0,12	0,00	1,38	0,44	1,94
45 a 49	0,04	0,41	3,21	1,99	5,64
50 a 54	0,49	0,87	0,48	3,29	5,13
55 a 59	1,34	4,44	2,39	3,81	11,98
60 y más	1,24	4,56	0,40	4,31	10,51
Total	9,60	21,67	8,78	46,57	86,62

En la tabla 19 se obtiene finalmente un estadístico de prueba de 86,52, valor que comparado con el valor crítico descrito en la tabla de X^2 de Pearson y que corresponde a 9,3904.

Como el valor crítico es menor al estadístico de prueba se acepta la hipótesis H_a y se rechaza la H_o .

8.2 Confección del protocolo de procedimientos necesarios para la detección de ADN genómico de VPH-ar en el equipo Cobas 4800, mediante la técnica de qPCR.

El instructivo de procedimientos para la detección de VPH-ar en células de cervix se realizó con el fin de optimizar y asegurar el correcto desempeño en

la pesquisa de VPH-ar, así como también el uso del equipo Cobas 4800 (ANEXO 1).

La estructura a considerar se definió en base a:

- 1.- OBJETIVO.
- 2.- ALCANCE/CAMPO DE APLICACIÓN.
- 3.- RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.
- 4.- DEFINICIONES.
- 5.- DESARROLLO.
- 6.- DISTRIBUCIÓN.



9. DISCUSIÓN.

Existe evidencia suficiente que vincula fuertemente la infección por VPH-ar al desarrollo de patologías de tipo oncogénicas variadas, particularmente la de cáncer cérvico uterino cuya gravedad según datos de GLOBOCAN en 2020 ocupó el tercer lugar en la población femenina chilena (GLOBOCAN, 2020). Debido a que posee una alta incidencia y prevalencia no solo en Chile sino que a nivel mundial, estos datos fundamentan la implementación de diversas técnicas para la pesquisa de VPH-ar, siendo una de las más actuales aprobadas por la FDA la que se empleó en el desarrollo de este trabajo de investigación y que corresponde a la técnica de PCR en tiempo real denominada Cobas 4800 HPV test.

Esta técnica permitió detectar en 3 canales, distintos genotipos de alto riesgo oncogénico donde se encuentran los dos principales asociados a patologías anogenitales como son el VPH 16 (canal 2), VPH 18 (canal 3) y un pool de 12 genotipos de alto/probable/posible alto riesgo (canal 1). Además incluye un cuarto canal que corresponde al control de celularidad (β -globina) el cual permite verificar que se tiene suficiente material genético para desarrollar la prueba. La prueba para la detección de VPH-ar se implementó en el equipo automatizado Cobas 4800 lo cual otorga grandes ventajas comparativas respecto de otras técnicas, destacando aspectos como que los resultados entregados no son interpretaciones subjetivas del operador, también que posee una alta sensibilidad y un alto valor predictivo negativo (VPN) cercano al 100% (OPS, 2016). Por este hecho los periodos de tamizajes o control recomendados se pueden ampliar hasta 5 años mientras que con otras técnicas como el PAP ante un resultado negativo, debe realizarse nuevamente cada 3 años o menos de ser posible. (Bulkman NW *et al.* 2007). También otra ventaja frente al PAP es que este último no puede genotipificar los VPH-ar más comunes.

Dentro de las ventajas del Cobas 4800 HPV test es la cantidad de muestras que se pueden procesar, un total de 96 muestras por ejecución y el tiempo de procesamiento corresponde aproximadamente a 5 horas, reduciendo también el trabajo de laboratorio, evitando realizar movimientos repetitivos que pudiesen causar errores producto de la manipulación de muestras o

reactivos, así como también disminuye en gran medida la contaminación de éstos. Algo que se debe considerar respecto a otras técnicas menos automatizadas es que este tipo de pruebas reduce el costo de personal, ya que una persona puede procesar una mayor cantidad de muestras diarias y en paralelo realizar otras funciones dentro del laboratorio mientras se procesan las muestras.

Sin embargo, el sistema poseía algunas limitaciones y es que este proceso lo debe realizar sólo personal capacitado y con experiencia en el desarrollo de técnicas de PCR, así como el uso del equipo en cuestión. Igualmente se consideró tener mucha precaución de los tiempos de ejecución ya que posee un reloj interno que es estricto y se debe seguir la cadena de procesamiento en el tiempo programado, en caso contrario se anularía el proceso si se supera el tiempo límite.

Algunos factores importantes que afectaron el procesamiento de muestras fueron la presencia de inhibidores de la PCR (por ejemplo sanguinolencia mayor al 4% del volumen total) como también que no se haya alcanzado a superar el control interno de celularidad con lo cual se procedió a invalidar la muestra y solicitar una nueva, ocasionando que posiblemente se haya perdido el seguimiento de alguna paciente así como costos extras de equipamiento y reactivos referidos al Cobas 4800 HPV test. Cabe mencionar

que un resultado negativo no significa en todos los casos que no haya presencia de infección por algún genotipo de VPH-ar sino que probablemente la cantidad de material genómico amplificado no alcanzó a superar el umbral de corte para la qPCR que es determinado por el programa del equipo según las instrucciones del fabricante y que corresponde a un mínimo de 600 copias/mL.

Otro factor de gran importancia es la edad en que se aplica el tamizaje o toma de muestra para el HPV test, ya que según las recomendaciones de la guía clínica del MINSAL y del “PROGRAMA DE CANCER DE CUELLO UTERINO: VPH REALIZADOS E INFORMADOS SEGÚN RESULTADOS Y GRUPOS DE EDAD” realizado en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano, el examen se debe aplicar principalmente en mujeres de 30 años o mayores ya que a menores edades la frecuencia de infección por el VPH humano es alta pero tienden a desaparecer en el transcurso de 1 a 2 años, siendo en casi un 90% infecciones de tipo transitorias (Rodríguez, et al., 2008). Así, se evita que la paciente reciba tratamientos innecesarios, se generen falsos positivos de alguna infección no persistente, se sobrecargue el sistema de salud donde sean atendidas o se eleven los costos asociados a tratamientos y del personal capacitado.

En cuanto a los resultados obtenidos tras el procesamiento de las 4.243 muestras:

Se invalidaron 41 muestras (1%), por lo que se solicitaron nuevas muestras a las pacientes correspondientes, probablemente por error en la detección del control de β -globina o por no presentar las condiciones óptimas para su procesamiento (coágulos, sanguinolencia mayor al 4% del volumen total, escaso volumen).

La prevalencia de positividad para los genotipos de VPH-ar en las mujeres chilenas mayores de 30 años fue de un 13% (549/4.202), valor comparable al obtenido por Ferrecio *et al.*, 2004 que fue de un 14%. Además, a nivel latinoamericano las cifras no son muy distintas, en Colombia se tuvo un 14,8% (Molano *et al.*, 2002), 14,5% en México (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001) y un 16% en Costa Rica (Herrero *et al.*, 2000).

Si bien la prevalencia total fue de un 13%, pero si se detalla según los rangos etarios, se evidencia que en la población comprendida entre 30-34 años como la de 35-39 años, hubo un porcentaje de positividad para VPH-ar con un promedio de un 21% y 18%, respectivamente y la tendencia a mayores edades también fue una disminución de los porcentajes VPH (+). Por lo tanto, se infiere que en este estudio tendrían un mayor riesgo de padecer cáncer cérvico uterino las poblaciones cuya edades fluctúan entre los 30-39 años.

La diferencia en la positividad de cada grupo de genotipos estudiados mostró un porcentaje de positividad de 75% para los 12 VPH-ar agrupados, un 19% para el VPH 16 y un 6%. para el VPH 18 (figura 1). Esta información

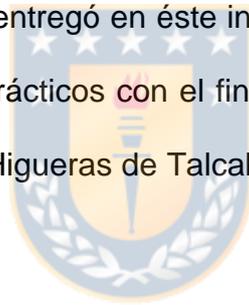
es relevante ya que se encontró en mayor medida genotipos de alto/probable/posible riesgo, pero sin poder diferenciar si hay algún genotipo que predomine sobre otro y que pudiese tener mayor relevancia frente a patologías oncogénicas más agresivas como se sabe en particular de los VPH 16 y 18. Además, el porcentaje de VPH 16 fue 3 veces mayor respecto al VPH 18, lo que era esperable ya que si bien el VPH 18 es uno de los más frecuentemente encontrados en afecciones anogenitales se sabe que el VPH 16 es aún más frecuente mundialmente. (Chacón et al., 2007)

La población estudiada presentó una positividad para coinfecciones similares en los distintos rangos etarios; sin embargo, en las pacientes de edad más avanzada correspondiente a mujeres mayores de 50 años se observó una mayor cantidad de coinfecciones múltiples, lo que se puede deber al deterioro del epitelio cervical producto del envejecimiento natural. De todas las muestras analizadas, en 50 de ellas se informó coinfección por más de un tipo de VPH-ar siendo 3 de ellas positivas para el VPH 16, VPH 18 y alguno de los 12 VPH-ar agrupados. Se encontró que la coinfección por VPH 16 / VPH AR* fue de 4:1 respecto a la de VPH 18 / VPH AR*.

Para evaluar si existía alguna relación entre la edad y la prevalencia de la infección por genotipos de VPH de alto riesgo se empleó un test estadístico correspondiente al de Chi-cuadrado, ya que son variables categóricas (de conteo) de tipo nominal. De los valores obtenidos se debió rechazar la hipótesis nula (Ho) la cual indicaba que las variables de edad y VPH-ar

oncogénicos eran independientes entre sí. En su lugar se estableció que estas son variables dependientes como lo indicó la hipótesis alternativa (H_a), puesto que el valor crítico de 9,3904 obtenido de la tabla considerando 18 grados de libertad y un nivel de significancia de 5% fue menor al valor estadístico de prueba de 86,52.

La confección del instructivo fue elaborada para conocer los distintos parámetros involucrados en la ejecución de la técnica de qPCR empleada en el Cobas 4800 HPV test, así como también para aclarar que personal puede realizar esta prueba. Se entregó en ésta información general sobre aspectos teóricos como también prácticos con el fin de ser utilizado en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano para mejorar el desempeño de la técnica.



10. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.

Hay una gran cantidad de infecciones por VPH-ar de genotipos agrupados de los cuales no se tiene mayor evidencia, ya que el equipo entrega un resultado total y sería relevante evidenciar si hay algún genotipo de la lista que se encuentre en mayor proporción para evaluar su nivel de malignidad de forma particular, ya que las vacunas aplicadas en Chile sólo son

profilácticas para los genotipos de VPH de alto riesgo 16 y 18 y de bajo riesgo VPH 6 y 11.

Se espera que este trabajo sirva para orientar la realidad de la Provincia de Concepción ya que actualmente la mayoría de trabajos que informan acerca de la prevalencia y coinfecciones para virus papiloma humano de alto riesgo pertenecen a la Región Metropolitana y se sabe que las infecciones varían de acuerdo a la realidad regional.

En un futuro sería relevante comparar los datos que se obtuvieron del test de VPH para Cobas 4800 con los PAP realizados en el Hospital Las Higueras de Talcahuano con el fin de realizar un análisis estadístico que demuestre si los datos se correlacionan o se deban realizar modificaciones futuras, ya sea en el procesamiento de muestras para mejorar la sensibilidad del test de VPH. También sería adecuado para optimizar los recursos y tiempos empleados, utilizar la prueba de Cobas 4800 HPV test como cribado primario siempre que se demuestre que posee una mayor confirmación diagnóstica que el Examen de Papanicolaou.

10. BIBLIOGRAFÍA.

Baker T, Newcomb W, Olson N, Cowser L, Olson C, Brown J. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys.* 60:1445-1456.

Beltrán J. 2014. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano *Revista CENIC.* 45(2):108-118.

Bernard H, Burk R, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur Hausen H, De Villiers E. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 401:70–79.

Bernard H, Burk R, De Villiers E, Zur Hausen H. 2011. Family-Papillomaviridae. *Virus Taxonomy.* San Diego: Elsevier. 235-48.

Bleeker M, Hogewoning C, Voorhorst F, Van den Brule A, Snijders P, Starink T, Berkhof J, Meijer C. 2003. Condom use promotes regression of human papillomavirus-associated penile lesions in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 107(5):804-10.

Bosch, F, Lorincz A, Muñoz N, Meijer C, Shah K. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology,* 55(4), 244–265.

Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3:1151-1157.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of cancer incidence and mortality for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68:394–424.

Brianti P, De Flammoneis E, Mercuri S. 2017. “Review of HPV-related diseases and cancers,” *New Microbiologic,* 40(2):80–85.

Brimer N, Drews C, Vande Pol S. 2017. Association of papillomavirus E6 proteins with either MAML1 or E6AP clusters E6 proteins by structure, function, and evolutionary relatedness. *PLoS Pathog.* 13(12): e1006781.

Buck C, Day P, Trus B. 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology,* 445(1-2), 169–174.

Bulkmans NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. 2007. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*. 24;370(9601):1764-72.

Burk R, Ho G, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. 1996. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis*. 174(4):679–89

Burk R, Chen Z, Van Doorslaer K. 2009. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 12(5-6):281-90.

Castro L, Manzo J, Muñoz J, et al. 2019. The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Sci Rep* 9,13620.

Chacón J, Sanz I, Rubio M, de la Morena M, Díaz E, Mateosa M, Baquero F. 2007. Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 25(5):311-316.

Chan C, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. 2019. "Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives", *Journal of Oncology*. 2019:11.

Chow L, Broker T, Steinberg B. 2010. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis*. 118:422-449.

Clark M, Hartley A, Geh J. 2004. Cancer of the anal canal. *Lancet Oncol*. 5(3):149–57.

Concha R, Marcela. 2007. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Revista chilena de infectología*. 24(3); 209-214.

Cox J, Lorincz A, Schiffman M, Sherman M, Cullen A, Kurman R. 1995. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. 172(3):946-54.

Culp TD, Christensen ND. 2004. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*. 319:152–61.

- Daling J, Madeleine M, Schwartz S, Shera K, Carter J, McKnight B, Porter P, Galloway D, McDougall J, Tamimi H. 2002. A Population-Based Study of Squamous Cell Vaginal Cancer: HPV and Cofactors. *Gynecol Oncol.* 84:263–270.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT. 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 307:1–11.
- De la Fuente D., Guzmán S., Barboza O., González R. 2010. Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria.* 12(49):231-238
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324:17–27.
- DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, 445(1-2):99–114.
- Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology.* 32:7–15.
- Doorbar J. 2013. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 445(1-2):80-98.
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:3812-3815
- Dyson N, Howley PM, Munger K, et al. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243:934
- Egawa K. 2003. Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology.* 207:251–4.
- Ferreccio C., Prado R., Luzoro A., Ampuero S, Snijders P., Meijer C., Vaccarella S., Jara A., Puschel K., Robles S., Herrero R., Franceschi S. and Ojeda J. 2004. Population-Based Prevalence and Age Distribution of Human Papillomavirus Among Women in Santiago, Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1 (13) (12) 2271-2276.
- Franco E, Villa L, Sobrinho J, Prado J, Rousseau M, Desy M, et al. 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 180(5):1415–23.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck R, Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 75:1565–70.

Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(2):560-3.

Giuliano A, Harris R, Sedjo R, Baldwin S, Roe D, Papenfuss M, et al. 2002. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study. *J Infect Dis.* 186(4):462–9

Guan J, Bywaters S, Brendle S, Ashley R, Makhov A, Conway J, Christensen N, Hafenstein S. 2017. Cryoelectron Microscopy Maps of Human Papillomavirus 16 Reveal L2 Densities and Heparin Binding Site. *Structure.* 25(2):253-263.

Harden M & Munger K. 2017. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation research. Reviews in mutation research.* 772:3–12.

Herbst L, Lenz J, Van Doorslaer K, Chen Z, Stacy B, Wellehan J, Manire C, Burk R. 2009. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, *Chelonia mydas* papillomavirus 1 and *Caretta caretta* papillomavirus 1. *Virology.* 383:131–135.

Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. 2000. Estudio poblacional de la infección por virus del papiloma humano y neoplasia cervical en zonas rurales de Costa Rica. *J. Natl Cancer Int.* 92:464 –74.

Hiller T, Iftner T. 2004. The human papillomavirus. *HPV Handbook.* Taylor & Francis Group. 11-26.

Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang C, Burk R. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 338(7):423–8.

Horvath C, Boulet G, Renoux V, Delvenne P & Bogers J. 2010. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J.* 7:11.

Insinga R, Dasbach E, Elbasha E. 2009. "Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model," *BMC Infectious Diseases.* 9(1):119.

Jeon S, Allen-Hoffman B, Lambert P. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 69:2989–97.

Jhingran A. *Abeloff: Abeloff's Clinical Oncology.* 2008. Cancers of the cervix, vulva, and vagina; 4(91).

Joyce J, Tung J, Przysiecki C, Cook J, Lehman E, Sands J, et al. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interact with heparin and cell surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 274:5810–22.

Kesis T, Slebos R, Nelson W, et al. 1993. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:3988–92.

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. 2001. Epidemiología de la infección por VPH en mujeres mexicanas con citología cervical normal. *Int J Cancer.* 91: 412 –20.

Lizano M, Carrillo A & Contreras A. 2009. Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerol.* 4:205-16.

Longworth M, Laimins L. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:362-72.

Mantovani, F., Banks, L. 2001. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 20:7874-7887.

McBride A. 2008. Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. *Advances in Virus Research.* 72:55-205.

McBride A. 2013. The papillomavirus E2 proteins. *Virology,* 445(1-2):57–79.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. 2003. Organization of the human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for the selection of diagnostic markers. *J Virol* 77:10186–201.

Ministerio de Salud. *Guía Clínica Cancer Cérvicouterino.* 2015.

Modis Y, Trus B, Harrison S. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21:4754–62.

Molano M, Posso H, Weiderpass E, et al. 2002. Prevalencia y determinantes de la infección por VPH en mujeres colombianas con citología normal. *Br J Cancer*. 87:324–33.

OPS. 2016. Incorporación de la prueba del virus del papiloma humano en programas de prevención de cáncer cervicouterino. Manual para gerentes de programas de salud.

Parkin D, Bray F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 24(3):11-25.

Reid R, Stanhope C, Herschman B, Booth E, Phibbs G and Smith J. 1982. Genital warts and cervical cancer. I. Evidence of an association between subclinical papillomavirus infection and cervical malignancy. *Cancer*. 50(2):377–387.

Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(6):485–90

Rodríguez A, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle P E. Group, P. E. G. 2008. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 100(7): 513-517.

Roman A & Munger K. 2013. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(1-2):138–168.

Rubin M, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla A, Quint W, et al. 2001. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*. 159(4):1211–8.

Santos G, Márquez L, Reyes J, Vallejo V. 2015. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 53(2): S166-71

Sapp, M., C. Volpers, M. Muller, and R. E. Streck. 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.*76:2407-2412.

Scheffner M, Munger K, Byrne J, et al. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:5523–7.

Schmitt A, Rochat A, Zeltner R, Borenstein L, Barrandon Y, Wettstein FO, et al. 1996. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J Virol*. 70:1912–22.

Schiffman M. 1992. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 84(6):394–8

Selinka HC, Giroglou T, Sapp M. 2002. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology.* 299:279–87.

Silva R., León D., Brebi P., Ili C., Roa J., Sánchez R. 2013. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Revista chilena de infectología.* 30(2):186-192.

Terai M, DeSalle R, Burk R. 2002. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. *J Virol.* 76:10020–10023.

Thomas M, Pim D and Banks L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 18:7690-7000.

Trimble C, Hildesheim A, Brinton L, Shah K, Kurman R. 1996. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol.* 87(1):59–64.

Van Doorslaer. 2013. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology.* 445:11-20.

Van Doorslaer, K., Chen, Z., Bernard, H., Chan, PKS, DeSalle, R., Dillner, J., Forslund, O., Haga, T., McBride, AA, Villa, LL, Burk, RD, e ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology.* 99:989–990.

Walboomers J, Jacobs M, Manos M, Bosch F, Kummer J, Shah K, Snijders P, Peto J, Meijer C, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):12-9.

Wang, J & Roden, R. 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 445(1-2):175–186.

Werness B, Levine A, Howley P. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248:76–9.

White E, Kramer R, Tan M, Hayes S, Harper J, Howley P. 2012. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J Virol.* 86(24):13174-86.

Woodman C, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 357(9271):1831–6.

Zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 92(9):690–698.



11. ANEXO.

Anexo 1. En esta sección se encuentra el instructivo elaborado para el procesamiento de las muestras de células de cuello uterino a las que se les requiere pesquisar la presencia de VPH-ar utilizando el equipo automatizado Cobas 4800 y la técnica de PCR en tiempo real o qPCR. Este manual proporciona información general sobre aspectos teóricos como prácticos y ha sido diseñado con el fin de ser utilizado en el Laboratorio Clínico del Hospital Las Higueras de Talcahuano. Está dirigido a todos los profesionales que estén a cargo del procesamiento de las muestras que requieren el análisis de estos virus.



	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 1 de 81	

**INSTRUCTIVO PARA EL PROCESAMIENTO
 DE MUESTRAS DE CUELLO UTERINO
 PARA LA DETECCIÓN DE VPH-AR EN
 EQUIPO
 COBAS 4800 UTILIZANDO LA TÉCNICA DE
 QPCR.**

Elaborado por	Revisado por	Autorizado por
Brian Mella Godoy Interno de Bioquímica Facultad de Farmacia Universidad de Concepción	BQ. Eduardo Ross Riffo Encargado sección Biología Molecular C.C. Laboratorio Clínico Hospital Las Higueras	BQ. Isabel Muñoz Sandoval Jefe C.C. Laboratorio Clínico Hospital Las Higueras
Fecha: Mayo/2021	Fecha: Mayo/2021	Fecha: Mayo/2021

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 2 de 81	

1.- OBJETIVO.

El objetivo de este procedimiento es establecer el protocolo mediante el cual se procesarán las muestras de células cervicales para la detección de ADN genómico del VPH-ar mediante la técnica de qPCR.

2.- ALCANCE/CAMPO DE APLICACIÓN.

Este procedimiento se aplicará al equipo Cobas 4800, también a todos los profesionales (Bioquímicos y Tecnólogos Médicos) que lo utilicen en la sección de Biología Molecular.

3.- RESPONSABLES DE LA EJECUCIÓN.

El responsable de ejecutar este instructivo será el Bioquímico o Tecnólogo Médico asignado por el encargado de la sección de Biología Molecular.

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 3 de 81	

4.- DEFINICIONES.

4.1 VPH-ar: Corresponden a virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico como el VPH 16 y VPH 18.

4.2 Muestra de VPH-ar: Muestras que se obtienen desde células de cuello uterino utilizando un cepillo o espátula endocervical.

4.3 qPCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

4.4 LIS: Sistema Informático de Laboratorio.

4.5 Vortex: Agitador o dispositivo que se usa comúnmente en los laboratorios para homogenizar mediante vibración pequeños tubos o frascos.

4.6 Cobas 4800: Equipo automatizado donde se realiza la extracción de ADN (Cobas x 480) y la técnica de PCR en tiempo real (Cobas z 480).

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 4 de 81	

5.- DESARROLLO.

5.1 Antes de comenzar el procesamiento de muestras se deberán realizar los procedimientos de encendido de los equipos en el siguiente orden: placa calefactora, equipo Cobas x 480, analizador Cobas z 480 y finalmente la unidad de control del sistema Cobas® 4800 con software del sistema versión 2.1 o superior. Posteriormente se debe realizar el mantenimiento del sistema siguiendo las instrucciones que se indiquen en la pantalla del equipo Cobas 4800.

5.2 Listo el paso anterior se deberá iniciar una nueva ejecución haciendo clic en el menú en la opción "Nueva ejecución".

5.3 Luego se seleccionará el tipo de flujo de trabajo que será "Completo" y marcando en la lista disponible donde aparece la prueba para "VPH".

5.4 Se ingresará un nombre de ejecución y luego se debe hacer clic en "Aceptar" para continuar.

5.5 Para la carga de muestras es necesario que deban estar a temperatura ambiente antes de ser cargadas en el instrumento Cobas x 480 y homogenizar los contenedores primarios (PreservCyt) agitándolos unos

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 5 de 81	

segundos en el vortéx para resuspender las células inmediatamente antes de la carga, a continuación se destaparán y rotularán cada una de las muestras para que cuando finalice el procesamiento se vuelvan a tapar y evitar contaminación de la muestra.

5.6 El software del equipo Cobas 4800 posee un asistente de carga por lo que este indicará cada uno de los pasos a seguir para la carga de muestras y reactivos.

5.7 A continuación se deberá seleccionar un tipo de muestra que en este caso corresponderá a "PC" para solicitar una muestra PreservCyt.

5.8 Se seleccionará el resultado solicitado para cada muestra escogiendo el subtipo de prueba "Panel de VPH de alto riesgo más genotipado" para informar el VPH de alto riesgo y los resultados de VPH 16 y VPH 18 separados.

5.9 Posteriormente para realizar la carga de consumibles todos los reactivos a excepción de la master MIX y la solución de Mg/Mn deben estar a temperatura ambiente antes de ser cargados en el instrumento Cobas x 480, ya que se almacenan entre 2-8°C. Se deberá seguir la guía del asistente de software que indicará en que posición debe ir cada uno ellos

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 6 de 81	

verificando que el código de barra específico para cada reactivo sea claramente visible para el lector del equipo.

5.10 Los controles para VPH (+) y VPH (-) se cargarán en el soporte de los reactivos durante la carga de estos en las posiciones A1 y B1 correspondientemente ya que en cada placa de pocillos de pozos profundos y placa de micropocillos está reservado un sitio para cada control.

5.11 El sistema de Cobas 4800 cuenta con un reloj interno para monitorear el tiempo que los reactivos están a bordo del proceso. Una vez que se escanea el buffer de lavado, se tendrá 1 hora para completar el proceso de carga y hacer clic en el botón Iniciar, posterior a esto se mostrará un temporizador de cuenta regresiva en la pestaña “Lugar de trabajo”. El sistema no permitirá que se inicie la ejecución si el temporizador integrado ha expirado por lo que es importante verificar que se cuenta con todos los reactivos antes de comenzar el flujo de trabajo.

5.12 Para asegurar que las partículas de vidrio magnéticas sean transferidas de forma correcta es necesario agitar vigorosamente el frasco que las contiene en vórtex antes de verterlo en el depósito de reactivo.

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 7 de 81	

5.13 Para realizar la carga de los reactivos de preparación de muestras (WB, MGP, EB, SDS y LYS) en sus respectivos depósitos con código de barras se utilizará el método "escanear-escanear-verter-lugar" como se indica a continuación:

- Escanear el código de barras de la botella de reactivo.
- Escanear el código de barras del depósito de reactivo.
- Verter el reactivo en el depósito.
- Colocar el depósito de reactivo lleno en la posición designada en el soporte de reactivo.

5.14 Los depósitos de reactivos para verter los consumibles están disponibles en tamaños de 200mL y 50 mL, por lo que, es importante seguir la guía del asistente de software para seleccionar los tamaños de depósito adecuados y asegurando que los códigos de barras del depósito de reactivo deben estar a la derecha del portador.

5.15 Los reactivos de amplificación/detección (HPV MMX y HPV Mg/Mn), los controles [VPH (+) y VPH (-)] y la proteinasa K se cargarán directamente en el soporte de reactivos y el instrumento Cobas x480 los escaneará y verificará automáticamente ya que todos los reactivos y depósitos de reactivos están codificados con un código de barras diseñado para un solo uso, de manera que el software del Cobas 4800 rastrea el uso

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 8 de 81	

y estado de los reactivos y los depósitos de reactivos y rechaza los usados anteriormente. También el software verificará que se hayan cargado suficientes reactivos en el instrumento así como el rastreo de la fecha de caducidad de todos los reactivos (los reactivos que superen esta fecha de caducidad no se aceptarán para su uso).

5.16 Se iniciará la preparación de la muestra haciendo clic en la opción del menú "Iniciar ejecución".

5.17 Una vez que se complete con éxito la preparación de la muestra, se procederá a hacer clic en la opción "Descargar" para descargar el soporte de la placa.

5.18 Una vez descargada se deberá sellar la placa de micropocillos con el film especial para el equipos Cobas 4800.

5.19 Luego de sellar la placa de micropocillos se deberá transportar la placa al analizador Cobas z 480 e iniciar la ejecución de amplificación y detección.

5.20 La amplificación y la detección deberán iniciarse lo antes posible, pero a más tardar en un tiempo máximo de 90 minutos después de la adición de la master MIX a las muestras preparadas. Se mostrará un temporizador

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 9 de 81	

de cuenta regresiva en la pestaña Lugar de trabajo y si se supera este tiempo el sistema abortará la ejecución si el temporizador ha expirado.

5.21 Finalmente cuando se logre completar el ciclo de amplificación y detección, se procederá a la descarga de la placa de micropocillos del analizador Cobas z 480 para revisar y aceptar resultados.

6.- DISTRIBUCIÓN.

Sección Biología Molecular / IAAS



7.- REGISTRO.

N/A

8.- DOCUMENTO DE REFERENCIA.

N/A

	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 10 de 81	

12.- ANEXOS.

N/A



	Código: APL1.3-BM-P1.1	
	Edición: Primera	
	Fecha: Julio 2021	
	Página 11 de 81	

