



***COMPARACION ENTRE LA IDENTIFICACION DE VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO EN MUESTRAS EMPAREJADAS DE TEJIDO CERVICAL Y ORINA***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C.

2019



***COMPARACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO EN MUESTRAS EMPAREJADAS DE TEJIDO CERVICAL Y ORINA***

BARBOSA RODRIGUEZ LISSETH CAROLINA

BENITEZ SALAMANCA ANGIE PAOLA

SARA CECILIA SOTO DE LEÓN, D.Sc.

Asesor externo

CLARA ESPERANZA TRUJILLO GAMA, MSc.

Asesor interno

Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
PROYECTO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
2019**

DEDICATORIA

En primer lugar, a mis padres, pues a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar, siempre me han brindado lo mejor, me han apoyado en cada paso que doy y me han acompañado en cada logro conseguido, por mínimo que sea.

A mis hermanos y hermana, por cada consejo que me brindaron y cada palabra de apoyo que me dieron cuando más lo necesitaba, siempre guiándome desde su experiencia como profesionales que son.

A mi novio, por permitirme compartir con él este proceso, darme apoyo ante cualquier situación inesperada que surgiera, servirme de inspiración y llenarme de motivación.

A mi compañera de tesis, pues este logro es resultado de un proceso conjunto desde hace más de dos años, en el que hemos aprendido a trabajar en equipo y salir adelante a pesar de las dificultades que se presenten.

Angie Paola Benítez Salamanca

DEDICATORIA

Inicialmente a Dios, por darme las fuerzas necesarias para superar las dificultades que se me han presentado a lo largo de la vida, por permitirme conseguir poco a poco mis sueños y poder seguir luchando por muchos más.

Deseo dedicarles este trabajo a mis padres, ya que ellos a lo largo de mi vida han sido mi fuente de energía, mi mayor motivación en cada paso que doy, y mi mayor apoyo frente a cada dificultad que se me ha presentado, siendo mis mayores modelos de vida y superación, quienes me han orientado y han hecho de mí una mejor persona.

A mis amigos, los cuales me han escuchado, apoyado y aconsejado en momentos donde he necesitado un respiro

Por último y no menos importante a mi compañera de proyecto por su paciencia, compromiso, dedicación y esfuerzo, donde aprendimos a trabajar como un equipo y en caminar nuestras ideas para un bien en común

Lisseth Carolina Barbosa Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, por guiarnos en cada paso que doy, y darnos fortaleza para continuar en este proceso.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC, por permitirnos realizar el proyecto de grado en sus instalaciones, proporcionarnos los elementos y herramientas necesarias para la elaboración del mismo y por permitirnos contar con educadores de calidad

A la Doctora Milena Camargo y la Doctora Sara Cecilia Soto de León, quienes han sido orientadoras de calidad, nos ha permitido crecer profesionalmente mediante sus enseñanzas, por su paciencia en este proceso de formación donde a pesar de las dificultades siempre intentan corregir nuestros errores de la mejor manera y por su apoyo en la realización de nuestro trabajo

A la Docente Clara Esperanza Trujillo Gama, quien ha sido una educadora de calidad, que por medio de sus enseñanzas nos ha permitido resolver las dificultades, y crecer como profesionales, por su paciencia, entrega y compromiso ofrecido durante todo este proceso y su apoyo incondicional.

Por último, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, la cual siendo nuestra alma mater nos enseñó que para conseguir nuestros sueños debemos ir escalando, para lograr nuestros propósitos y metas debemos esforzarnos, donde durante estos cinco años hemos superado muchas dificultades, las cuales nos permitieron crecer personal y profesionalmente

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
INTRODUCCION.....	14
1. ANTECEDENTES	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo general	22
2.1.1 Objetivos Específicos	22
3. MARCO REFERENCIAL	23
3.1. Virus del Papiloma Humano:	23
3.2. Taxonomía Viral:.....	23
3.3. Historia natural de VPH:	24
3.3.1. Factores de riesgo asociados a la infección por VPH.....	26
3.3.2. Lesiones cervicales generadas por VPH:	26
3.4. Genoma de VPH.....	28
3.5. Proteínas estructurales	29
3.6. Proteínas no estructurales	29
3.7. Proteínas oncogénicas: E6 y E7	30
3.8 Test de Papanicolaou o citología cervical	31
3.9 Reacción en cadena de la Polimerasa para la detección de VPH:	33

3.10 PCR en tiempo real empleando plataforma cobas.....	34
4. DISEÑO METODOLOGICO	36
4.1. Tipo de investigación	36
4.2. Población	36
4.3. Técnicas y procedimientos	37
4.3.1. Consideraciones éticas.....	37
4.3.2. Toma de muestra de orina	38
4.3.3. Toma de muestra cervical.....	38
4.3.4. Criterios de inclusión.....	41
4.3.5. Criterios de exclusión	41
4.4. Extracción de ADN:	42
4.5 Detección de VPH por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR)	42
4.6. Electroforesis:.....	45
4.7. PCR en tiempo real empleando cobas ® 4800	46
4.8. Análisis estadístico	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Características de la población	47
5.2. Asociación entre los distintos tipos de infección	50
5.3. Frecuencia de VPH y tipos virales.	52

5.4. Coinfección por otros tipos de VPH - HR en muestras de tejido cervical, y orina.	54
5.5. Comparación VPH - HR en muestras de tejido cervical, de orina, COBAS y resultado citología	56
5.6. Características operativas de las pruebas	58
6.DISCUSIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
7.CONCLUSIONES.....	67
8.REFERENCIAS	68

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Progresión de la infección por VPH	26
Figura 2. Cambios histológicos en las lesiones precancerosas y cancerosas del CCU	28
Figura 3. Obtencion de muestras	41
Figura 4. Acumulado de infección de VPH-HR en muestras de tejido cervical y orina	53
Figura 5. Comparación de resultados en la detección de VPH en los dos tipos de muestra utilizadas en el estudio.	54
Figura 6. Frecuencia de VPH 16, VPH 18, VPH - HR según los dos tipos de muestra y controles de COBAS 4800	55
Figura 7. Coinfeccion con otros tipos de VPH - HR en muestras de tejido cervical , de orina y COBAS 4800	56
Figura 8. Comparación de la detección de VPH – HR en citología normal (n=131) y citología anormal (n=82), de acuerdo a la fuente de muestra (orina, tejido cervical) y a la prueba de COBAS	59

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Condiciones de temperatura para ensayo PCR de B – globina	44
Tabla 2. Condiciones de PCR para tres protocolos de detección genérica de VPH	45
Tabla 3. Descripción de cebadores y producto amplificado	46
Tabla 4. Características sociodemográficas de la población estudiada	50
Tabla 5. Regresión logística de los factores de riesgo de las mujeres incluidas en el estudio con el tipo de infección por VPH	52
Tabla 6. Comparación de la detección de VPH – HR en orina, tejido cervical y cobas de acuerdo al hallazgo citológico (n=213)	57
Tabla 7. Características operativas de las pruebas en las muestras de orina, tejido cervical y COBAS 4800	60



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLINICO

***COMPARACIÓN ENTRE LA IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO EN MUESTRAS EMPAREJADAS DE TEJIDO CERVICAL Y ORINA***

RESUMEN

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), es una de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más frecuentes en hombres y mujeres, donde con una infección persistente puede llegar a generar Cáncer de Cuello Uterino (CCU), el cual sigue siendo un grave problema de salud pública alrededor del mundo, el cual ocupa el segundo lugar entre los cánceres que afectan al género femenino, como se evidencia en América del Sur donde Colombia presenta un 48.2% de incidencia de CCU.

El VPH hace parte de una familia de virus de ADN capaces de infectar queratinocitos de la piel y mucosas. Estos virus están involucrados en una variedad de lesiones de importancia clínica que van desde verrugas benignas, como también lesiones intraepiteliales de alto y bajo grado NIC, y CCU, dependiendo del tipo de VPH involucrado en la infección. 40 tipos de VPH son capaces de infectar la mucosa genital, los tipos de VPH se clasificaron de “alto grado” o tipos oncogénicos ya que son capaces de generar cáncer, y tipos no oncogénicos o de “bajo grado” al

ser estos productores de verrugas genitales. Los tipos VPH 18 y 16 son los tipos oncogénicos más comunes, mientras que VPH 11 y 6 son los tipos de “bajo grado” más frecuentes.

El virus de papiloma humano (VPH) como principal agente etiológico del cáncer de cuello uterino (CCU), se considera de importancia en salud pública, pues se estima que la mayor parte de la población ha tenido al menos un tipo de VPH a lo largo de su vida, y aunque no todos los tipos virales llevan a una progresión del cáncer y pueden resolverse solos, es necesario realizar una detección temprana y oportuna de aquellos tipos virales que puedan indicar un riesgo mayor, como los de tipo oncogénico.

En muestras de tejido cervical y de orina de 216 mujeres del departamento del Amazonas, se realizó la detección de ADN de ocho tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 Y 58) mediante PCR; a partir de esto se establecieron las características operativas de cada tipo de muestra, tomando como Gold estándar el test de Roche Cobas® 4800 HPV. La idea de la utilización de la orina como muestra opcional para la detección de VPH es de gran valor ya que se pretende eliminar barreras culturales y sociales favoreciendo que las mujeres accedan a la realización del examen.

El presente estudio detecto VPH –HR en muestras emparejadas de tejido cervical y de orina, las cuales arrojaron resultados similares (14, 35 para muestras de tejido cervical y 10,35 muestras de orina), donde al ser comparadas con el test de referencia Roche Cobas® 4800 HPV este detecto VPH – HR en un 16,59. A su vez, las características operativas de las pruebas (PCR), utilizadas en muestras de tejido cervical, y de orina, arrojaron mayor sensibilidad en muestras de tejido cervical frente a la detección de VPH – HR como lo son VPH 31, VPH 33, VPH 52 y VPH 58.

Por otra parte, en muestras de tejido cervical emparejadas con muestras de orina se presentó mayor sensibilidad en la detección de VPH – HR en muestras de tejido cervical, y en términos de especificidad las dos muestras arrojaron resultados similares (14,35 muestras de tejido cervical y 10,65 muestras de orina).

Los resultados del presente estudio han permitido determinar la técnica de auto muestreo (orina), como una herramienta eficaz y económica para ser utilizada en el cribado de CCU, la cual es presentada como una técnica de mayor aceptabilidad entre las mujeres.

PALABRAS CLAVES

Cáncer de cuello uterino (CCU), Virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-HR).

INTRODUCCION

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino (CCU) ocupa el cuarto lugar entre las mujeres; según estadísticas de GLOBOCAN en el año 2012 se reportaron 528.000 casos nuevos, presentándose un 85% de estos casos en regiones menos desarrolladas, donde casi 9 de cada 10 muertes ocurren por este cáncer (1). En Colombia, el CCU ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama, se encuentra entre los cánceres más frecuentes en la población femenina, concluido también por estadísticas de GLOBOCAN para el año 2012 (2).

La infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal agente etiológico del CCU (3). En la actualidad, se han identificado más de 100 genotipos de VPH según sus diferencias en la secuencia de ADN, los cuales se han dividido en alto y bajo riesgo de acuerdo con su asociación oncogénica (4).

En Colombia, los programas de promoción de la salud y prevención de la enfermedad enfocados al control de patologías como el cáncer cervical son de suma importancia, ya que esta enfermedad produce una alta morbi-mortalidad en las mujeres de nuestro país. Según estudios epidemiológicos realizados en el 2017 por el INS sobre CCU se notificaron 2.735 casos confirmados de CCU (36,2% del total casos), con un promedio de tasa cruda de 3 por 1'000.000 de mujeres mayores de 18 años en lugares donde existe un estilo de vida menos favorable, con costumbres culturales diversas, un nivel educativo menor y variables sociodemográficas, que facilitan la generación y persistencia de la infección por VPH como lo es en el departamento del Amazonas. (5)

Un estudio realizado por el INS sobre mortalidad de CCU y próstata por municipio demuestra que las tasas de mortalidad por estos cánceres son más altas en los departamentos con

una desigualdad socio-económica muy grande. Se reportó la mayor tasa de CCU en municipios muy pobres, mientras que las menores tasas se reportaron en los municipios de mayor nivel económico (5).

En el INFORME DE EVENTO CÁNCER DE MAMA Y CUELLO UTERINO, COLOMBIA, 2017 presentado por el INS, se relacionan estrategias como el plan decenal de salud pública el cual pretende incrementar los programas de detección temprana del cáncer como enfermedad no transmisible, a su vez el plan decenal del control del cáncer presenta lineamientos para la detección temprana, atención de la población afectada promoviendo la disminución de la mortalidad y los factores de riesgo asociados a la progresión de cáncer(5)

La citología cervical es considerada la herramienta más ampliamente utilizada para la realización de la tamización de CCU a nivel mundial (6, 7), en países en desarrollo como Colombia por el escaso acceso a pruebas de detección eficaces, la enfermedad no se detecta hasta las fases más avanzadas (8), por lo cual, el uso de herramientas suplementarias al Test de Papanicolaou, como las aportadas por la biología molecular, son útiles en la tamización de riesgo para CCU (6).

Como limitaciones de las mujeres frente al acceso a la toma de la citología, se han relacionado un conjunto de barreras estructurales, ajenas a las mujeres propiamente, dentro de las cuales se presentan fallas en los procesos en el envío de las muestras y la obtención de resultados, falta de material para la toma de citología, falta de infraestructura, escaso personal, desinformación del personal sobre procesos administrativos, poca comunicación y enseñanza por parte del personal médico a las usuarias. Adicionalmente, las variables psicosociales como bajo nivel económico y educativo, la desinformación por parte del individuo sobre la prueba, miedo al dolor o a resultados anómalos y factores culturales, son barreras usualmente encontradas (9).

Debido a la limitada aceptación de la citología en algunas mujeres, se realizó un primer estudio en Colombia que evaluó la correlación en la identificación del VPH en mujeres VIH positivas tanto en muestras cervicales como de orina, con el cual se logró determinar correlaciones del 87% y de tasas de prevalencia de VPH tipo específicas similares en los dos tipos de muestras emparejadas (10,11).

En cuanto la distribución viral tipo específica se describió que el VPH 16 fue el más prevalente en muestra de orina y muestra cervical, lo que coincide con datos encontrados de estudios previos realizados en la población en general (10,12).

Los resultados obtenidos en el estudio dejan como opción la utilización de muestras de orina para identificación de VPH en pacientes inmunocomprometidas, pero dejan aún la interrogante abierta sobre el comportamiento de estas técnicas en población sin inmunosupresión (10).

Ahora, la asociación entre la detección de ADN de VPH por PCR en muestras de orina y las anomalías del cuello uterino apoya el uso de la muestra de orina en las pruebas de detección, siendo una metodología de menor costo y con mayor aceptabilidad entre las mujeres (10,13). Por otro lado, estudios previos sugieren la utilidad de este tipo de muestra para identificar mujeres con riesgo de desarrollar lesiones pre cancerosas (10,14).

La orina como método de auto muestreo es aceptada en la población general por su fácil recolección (6), y al ser una muestra cuya recolección no requiere de un examen pélvico previene de la posibilidad de afectar el tejido cervical mitigando el riesgo de generar micro lesiones, las cuales son indispensables para el curso de la historia natural del VPH, ya que de esta forma se logra la colonización del tejido cervical (13).

Por este motivo el presente trabajo tiene como objetivo principal comparar el rendimiento de las pruebas moleculares como PCR convencional, para la detección de VPH – HR en muestras emparejadas de tejido cervical y orina, obtenidas de mujeres de los municipios de Leticia y Puerto Nariño del departamento del Amazonas, por medio de la descripción sociodemográfica de la población femenina estudiada , y a través, de la detección de VPH mediante la técnica de PCR convencional en las muestras de tejido cervical y de orina, determinando las frecuencias del VPH de los tipos de alto riesgo VPH-16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52 y -58 en las mujeres del estudio, y a partir de los resultados obtenidos ser capaces de determinar las características operativas: sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo y negativo) para la detección de VPH en los dos tipos de muestras.

1. ANTECEDENTES

De acuerdo con la información obtenida por el Ministerio de Salud y Protección Social que realiza el registro de personas diagnosticadas con CCU, éste cáncer ocupa el cuarto lugar entre los tumores malignos priorizados por la CAC en la población total, siendo el segundo más frecuente entre las mujeres con un aproximado de 15159 mujeres afectadas, y la segunda causa de muerte presente en el género femenino, después del cáncer de mama (15).

En 1928 el doctor Aurel Babes publicó su trabajo sobre el diagnóstico de CCU mediante frotis que había presentado un año antes ante la Sociedad de Ginecología de Bucarest. Posteriormente, en 1946 se estableció la Sociedad Americana del Cáncer, la cual impulsó la educación sobre la prueba de Papanicolaou. (16)

El doctor Harald zur Hausen propuso en 1975, basado en diversas evidencias de sus estudios e investigaciones, que el VPH era el agente etiológico del cáncer cervical (16), descubrimiento vital para hacerlo merecedor del premio Nobel de medicina en el año 2008 (17).

A inicios de los 80's Lutz Guissmann publicó las primeras secuencias de VPH aisladas de verrugas genitales del VPH-6 y el VPH-11 (18). A partir de dichas secuencias, se continuaron los análisis de otros VPH aislados de carcinomas, identificando tipos virales como el del VPH-16 aislado de un carcinoma cervical en 1983 y sus secuencias las utilizaron como sondas de hibridación (19) y al año siguiente identificaron la secuencia de VPH 18 (20).

Debido a los avances en el estudio del VPH, en los 90's se llevaron a cabo los primeros estudios de tipo epidemiológico y en esta misma década se determinó el papel de las proteínas del VPH E6 y E7 en la inactivación de los genes supresores de tumor p53 y pRb, estableciendo los principios de immortalización y transformación de los VPH (21,22).

En el 2000, por medio de la comprensión de la historia natural se mostró claramente que la infección por VPH precedió a la formación de CCU por años y que la transmisión sexual es el modo preponderante de adquisición (3).

La utilización de la prueba de Papanicolaou ha tenido gran impacto sobre la disminución de casos de CCU en países desarrollados en aproximadamente un 80% (23,24). La cifra de incidencia para CCU en países como España, es de aproximadamente 7,4 % por 100.000 mujeres ajustadas con las tasas a nivel mundial (25). Sin embargo, la mortalidad de casos por CCU en países subdesarrollados persiste debido a la falta de programas de detección eficaces y la poca adherencia a la tamización por medio de la prueba de Papanicolaou (26,24). Algunas razones para la limitada aceptación del cribado son el malestar del examen, la falta de conciencia, el acceso inadecuado, y problemas logísticos para la realización del mismo (27,24).

Mundialmente se ha demostrado que el cribado por medio de la detección de virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH – HR) es más eficiente que la citología para la disminución de pre cáncer y cáncer cervical (28,29), basado en la mayor sensibilidad de las pruebas de HR-HPV en comparación con la citología en neoplasia cervical de alto grado 2 (CIN 2), por lo que una prueba validada de VPH - HR en lugar de una citología se convierte en una herramienta aceptada para el cribado de CCU (29).

Dada la asociación entre VPH y CCU, son importantes todos los estudios que permitan mejorar o facilitar la detección viral, así como también, evaluar el tipo de muestra utilizada (30). La identificación de VPH por PCR generalmente se utiliza en hisopados cervicales o biopsias, lo cual acarrea las complicaciones e incomodidad que implica la toma y obtención de muestras para la citología cervical.

Debido a que las pruebas moleculares se tornan como el principal medio de detección de VPH, como complemento de la detección de anormalidades en el tejido, que se obtiene con la citología cervical, la evaluación del auto muestreo en la población femenina es de gran importancia ya que permitiría ofrecer una fuente de muestra que ofrecería las ventajas de mayor aceptación, representando un menor costo y facilidad (29).

El auto muestreo propuesto a partir de fluidos corporales como la orina, resulta ser una opción interesante a investigar. La orina como muestra para la detección de VPH ha sido objeto de un gran número de estudios e investigaciones, debido a las ventajas que ofrece como método no invasor, y además que el mismo paciente puede tomar la muestra (31). En un estudio realizado en Venezuela, se compararon los resultados obtenidos en muestras de hisopado cervical y de orina, con el fin de evaluar la efectividad de esta última. Los resultados observados determinaron similitud entre los resultados para cada tipo de muestra, demostrando así la posibilidad de usar la muestra de orina como método alternativo para la detección de la infección por VPH (30).

Así mismo en pacientes colombianas y europeas se han encontrado correlaciones entre las identificaciones de VPH en muestras cervicales y de orina, así como de la carga viral para VPH-16 en ambos tipos de muestra y su asociación con lesiones de cuello uterino (32,10).

Para el 2013, estudios realizados en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), sobre “Comparación de pruebas para la detección de VPH en cérvix y orina de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)”, se encontró una asociación positiva entre la anormalidad cervical y la detección de VPH en orina. (33). Estos resultados ponen en evidencia la posibilidad de desarrollar un diagnóstico efectivo para VPH empleando muestras de orina.

En el 2016 la Doctora Alba Lucia Combita y colaboradores realizaron un estudio denominado “Comparación entre muestras de orina y cervicales para la detección y tipificación del ADN del VPH en mujeres jóvenes en Colombia”, donde se utilizó la técnica PCR multiplex para la identificación de ADN de VPH en orina y tejido cervical, dando resultados similares entre las dos muestras pareadas con un 60,00% de prevalencia general de VPH en muestras cervicales y un 64,72% en orina, no obstante, VPH 16 fue el tipo viral mayormente identificado en los dos tipos de muestra(34).

Por otra parte, al definir la precisión de las pruebas utilizadas en la detección de orina tomando los resultados de tejido cervical como patrón de oro, donde la sensibilidad en muestras de orina fue de 79% para VPH 16 y 62% para VPH 18, mientras que la especificidad fue de 98% para VPH 18 y 96% para VPH 16, permitiendo obtener una validez de la detección de VPH en orina en comparación con la detección de VPH de tejido cervical usado como patrón de oro (34).

Por lo tanto, los hallazgos realizados permiten tener una fuerte evidencia sobre la detección de VPH en tejido cervical y orina los cuales brindan resultados comparables, por lo que, la orina podría utilizarse como un método simple, no invasivo para las pruebas de ADN del VPH que pueden ser auto recolectadas (34).

La utilización de muestras de orina podría fortalecer los programas de detección, ya que contribuye en la disminución de lesiones causadas en el tejido epitelial cervical, por lo que la orina como muestra no facilita la progresión natural de la enfermedad, es decir, el daño tisular presentado durante la realización de la citología (35,10)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Comparar el rendimiento de las pruebas moleculares como PCR convencional para la detección de VPH – HR en muestras emparejadas de tejido cervical y orina, obtenidas de mujeres de los municipios de Leticia y Puerto Nariño del departamento del Amazonas

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Describir socio demográficamente la población femenina estudiada.
2. Detectar el virus del papiloma humano VPH mediante la técnica de PCR convencional en muestras de tejido cervical y de orina.
3. Determinar las frecuencias del VPH de los tipos de alto riesgo VPH-16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52 y -58 en muestras cervicales y de orina de mujeres las mujeres del estudio.
4. Evaluar las características operativas: sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo y negativo) para la detección de VPH en dos tipos de muestras.

3. MARCO REFERENCIAL

Actualmente la infección por VPH se considera como carcinógeno para seis tipos de cáncer: cuello uterino, pene, vulva, vagina, ano y orofaringe (36), sin embargo, la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo de CCU, ya que en la mayoría de los casos (aproximadamente 80 %) la infección se resuelve espontáneamente. En un menor porcentaje, aquellas mujeres que cursan infección persistente con VPH de Alto riesgo, logran el desarrollo de lesiones precancerosas que progresan a CCU durante un periodo aproximado de 10 a 20 años (37), en un 70% de los casos causados por VPH de tipo 16 y 18 (38).

3.1. Virus del Papiloma Humano:

El virus del papiloma humano (VPH) miembro de la familia *Papillomaviridae*, es un virus de tamaño pequeño entre 52 y 55 nm de diámetro (39), que posee una estructura icosaédrica, no envuelto, el material genético de este virus tiene un tamaño de 7.500 a 8.000 pb dispuestos en ADN circular de doble cadena (40) y se caracteriza por tener afinidad por el tejido epitelial (39).

Dentro de la cápside del VPH, encontramos el genoma de ADN que contiene entre 8 y 9 marcos de lectura abierta (ORFs, por sus siglas en inglés) (39), cada uno de ellos representa un gen viral que codifica para una proteína responsable de características biológicas del virus (41).

3.2. Taxonomía Viral:

Los VPH son un grupo de virus que infectan animales y humanos, y su origen está relacionado con cambios en el epitelio del huésped, estos han evolucionado conjuntamente con su hospedador (42,43).

El VPH se divide en cinco géneros con respecto a las diferencias en sus secuencias de ADN, con tipos que tienen una secuencia de nucleótidos basados en la proteína L1 la cual difiere en un 10% entre los virus del papiloma (44,43).

Los VPH se dividen en géneros como Alfa, Beta, Gamma, mu y nu (45,46), entre el género Alfa se describen los VPH causantes de infecciones cutáneas y de la mucosa, a diferencia de los géneros beta, gamma y mu los cuales generan enfermedades cutáneas (46). El género Alfa contiene tipos de VPH de alto y bajo riesgo con respecto al resultado de la infección, ya que el primero es el factor principal para el progreso de lesiones del epitelio a carcinomas y el segundo produce papilomas benignos (46,47).

3.3. Historia natural de VPH:

VPH infecta las mucosas y sitios cutáneos, donde aprovecha el proceso organizado de renovación tisular en el epitelio estratificado y por efectos de una micro lesión causada en el epitelio por las relaciones sexuales, el virus infecta las células de la capa basal inferior del mismo (48,49), estableciendo a largo plazo una infección persistente en estas células (49). En el momento de diferenciación celular, se induce la replicación viral como también la expresión génica del virus, donde el virion de VPH se ensambla en capas, se libera del epitelio en células cargadas de virus, por la capacidad celular de auto renovación ésta asegura

la persistencia del virus por un largo plazo, como la evasión del sistema inmunológico ya que el VPH disminuye los niveles de proteínas virales en células más diferenciadas (49). **Figura 1.**

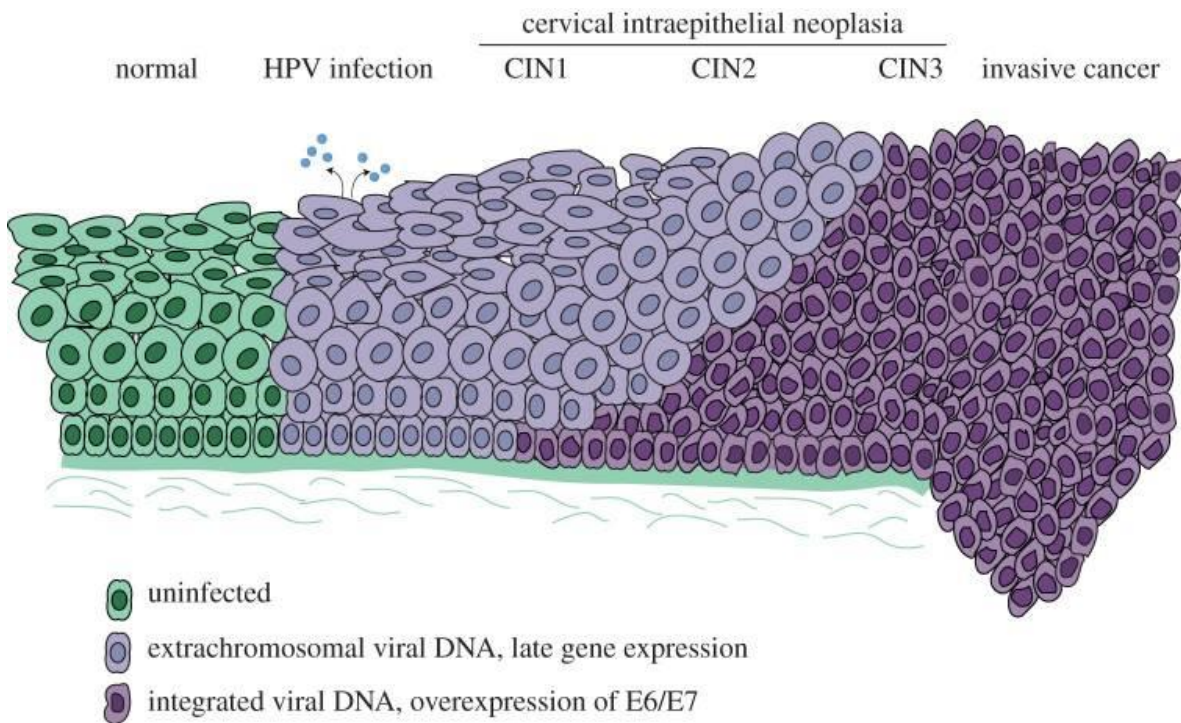


Figura 1. Progresión de la infección por VPH (49).

Al momento de infectar queratinocitos humanos, la cápside del virus interactúa con un receptor proteoglicano normalmente denominado sulfato de heparina, esta interacción con los queratinocitos, induce cambios conformacionales en la célula que permite la unión del virus a un segundo receptor (50,49)

Cabe resaltar que el ciclo viral de VPH contiene tres fases, en donde, la primera de ellas induce una amplificación de ADN viral limitada cuando VPH por primera vez ha infectado la célula basal, consecuente a esto se da una replicación del genoma viral

constante en las células con capacidad proliferativa de una lesión mejor llamada “replicación de mantenimiento”, y por último, para generar viriones y conservar la progenie viral, se da una amplificación dependiente de la diferenciación celular en donde se generan grandes cantidades de ADN de VPH (51,49).

3.3.1. Factores de riesgo asociados a la infección por VPH

La presencia de VPH en el cuello uterino es un factor necesario, pero no suficiente para la aparición de CCU, así como reporta el Instituto Nacional de Cancerología existen otros factores de riesgo que en conjunto con la infección persistente por VPH permiten el desarrollo de CCU tales como (52):

- El inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años
- Tener múltiples parejas sexuales, debido a que esto facilita la transmisión de ITS
- Contar con una ITS como Herpes genital, VIH, Chlamydia entre otras
- Fumar
- No realizase la citología de cuello uterino desde el inicio de la vida sexual mínimo cada tres años
- Deficiencia de vitaminas especialmente A y C como ayudantes en el fortalecimiento del sistema inmunológico

3.3.2. Lesiones cervicales generadas por VPH:

El CCU se desarrolla a partir de lesiones precursoras en la zona de transformación de la unión escamo-columnar después de haber ocurrido una infección por VPH, esto, en presencia de otros cofactores que ayudan a la progresión del cáncer (53).

De igual manera, se ha demostrado que poseer una infección por VPH es un factor necesario, pero no suficiente para la evolución de CCU, debido a que solo un pequeño número de mujeres expuestas a dicha infección, llegan a presentar neoplasias cervicales (54). Las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) son consideradas la entrada del cáncer o precursoras del mismo, siendo de pronóstico variable, puesto que, así como pueden progresar a estadios severos, también pueden regresarse. El tratamiento de estas, consiste en una escisión de la lesión, así como un seguimiento de la misma (53).

La infección de VPH, por sí sola es insuficiente para la progresión de CCU, puesto que en más del 80% de los casos se puede eliminar la infección espontáneamente, o mujeres con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, sigla en inglés) o con NCI grado I, pueden volver a un estado normal. Por tanto, para el desarrollo de lesiones más severas, debe persistir la infección por VPH, como en el caso de las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, sigla en inglés) o NCI grado II y III (47,54). **(Figura 2)**

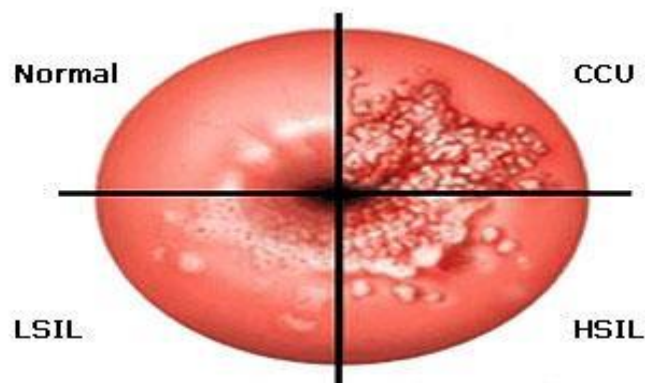


Figura 2. Cambios histológicos en las lesiones precancerosas y cancerosas del CCU (54).

Las NIC se han subdividido en tres grados según su extensión y gravedad: I, II y III. Si la displasia está limitada al tercio inferior del epitelio estamos en presencia de una NIC I también conocida como LSIL; si implica los 2/3 inferiores del epitelio se denominan NIC II y si las anomalías afectan a más de 2/3 de todo el espesor del epitelio hablamos de una NIC III; denominadas NIC II y III como HSIL (55).

3.4. Genoma de VPH

El genoma del VPH ha sido dividido en tres regiones principales: La región larga de control (LCR), una región temprana (E) y una región tardía (L) (42).

La LCR, también conocida como región no codificante, tiene un tamaño de aproximadamente 1 kb (39), contiene el origen de la replicación, y las secuencias promotoras y reguladoras de la expresión de genes, representando el 15% del genoma viral (41).

Los ORFs se agrupan en dos grupos, denominados genes de expresión temprana y genes de expresión tardía (39). La región temprana, codifica para proteínas no estructurales involucradas en la replicación y la oncogénesis del virus (56), entre las que encontramos E1, E2, E4, E5, E6 y E7, y representa el 45% del genoma viral (41). En la región tardía, que representa el 40% del genoma viral, encontramos dos ORFs que codifican para proteínas estructurales, las proteínas L1 y L2 (41).

3.5. Proteínas estructurales

La proteína L1, se conoce como la principal proteína de la cápside, por su participación en la entrada del virus a la célula hospedera (56), el gen que la codifica se caracteriza por ser de las regiones más conservadas entre los VPH de distintas especies y genotipos, siendo uno de los sitios blanco preferidos para su diagnóstico molecular (41).

La proteína secundaria de la cápside L2, participa en el proceso de encapsulación (56), además de la unión del virión, su entrada a la célula y transporte al núcleo (39).

3.6. Proteínas no estructurales

La proteína E1, participa en la replicación del ADN viral (41), pues tiene funciones de helicasa (39), esta proteína es codificada por el gen E1, el cual es el más grande, de aproximadamente 2kb, y así mismo es uno de los más conservados (56).

El gen E2 de aproximadamente 1100 pb, codifica para la proteína E2 (56), implicada en la transcripción y replicación de ADN viral, así como en la segregación genómica y la encapsulación (41). La proteína E2, actúa como un represor de la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7 (56).

Dentro del marco de lectura de E2, encontramos una secuencia de 260pb que codifica para la proteína E4 (56), dentro de sus funciones asociadas tenemos la regulación de la expresión de los genes tardíos L1 y L2, que controla la maduración viral y la salida de los viriones (39), al afectar la estabilidad de las células epiteliales (56).

La proteína E5, regula la actividad de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), desempeñando un papel importante en la proliferación celular (39); dicha proteína es codificada por el gen E5 de aproximadamente 230 a 250pb (56).

3.7. Proteínas oncogénicas: E6 y E7

Al analizar los carcinomas cervicales, se encontró que parte del genoma de VPH-HR estaba integrado en el genoma celular por las proteínas E6 y E7 siendo estos los genes que se expresan en la enfermedad (57,58), la transfección de los genes E6 y E7 en los queratinocitos basales de VPH - HR es necesaria para la immortalización de queratinocitos y evita la diferenciación de estas células basales (59, 58), ahora, resaltando la actividad de E7 el cual es capaz de immortalizar por si solo queratinocitos, sin embargo, se da una mayor eficiencia en la immortalización de estas células cuando E6 y E7 se expresan juntas (60,58).

Cuando se evalúa la actividad de E6 y E7 de bajo riesgo se evidencia la baja o poca actividad de immortalización, debido a que estos genes no son capaces de immortalizar estas células cuando se transducen a queratinocitos (60,58).

La proteína E6 tiene un peso molecular aproximado de 18KD, con 150 aminoácidos de longitud (61,58), siendo esta un oncogén conocido por su función en la unión y degradación de p53 de tipos de VPH de alto riesgo (62,58). E6 al inhibir la función de p53 podría afectar la habilidad de esta para inducir a las células a apoptosis e interrumpir el ciclo celular (58), por una parte, los E6 de VPH de alto riesgo tienen mayor capacidad de eludir la detección del ciclo

celular y evitar apoptosis en comparación con E6 de bajo riesgo, parte de su actividad es debida a la capacidad de inhabilitar la función de p53 (63,58).

Por otra parte, las proteínas E7 de VPH contienen 100 aminoácidos aproximadamente (50-46), sin embargo, la proteína E7 de VPH de alto riesgo tiene la habilidad de unirse a la proteína supresora de tumores retinoblastoma Rb (64,58). La proteína E7 junto con E6 son capaces de inmortalizar los queratinocitos humanos como huésped principal de VPH (65,66), debido a que VPH E7 tiene la capacidad de neutralizar las funciones de las proteínas de retinoblastoma pRb las cuales son esenciales para el control del ciclo celular (67,66).

3.8 Test de Papanicolaou o citología cervical

La infección por VPH representa un problema de salud pública de vigilancia mundial debido a su asociación con el CCU; pruebas como el test de Papanicolaou permiten la detección de lesiones cervicales pre-cancerosas, y por tanto desempeña un papel importante en la disminución de las tasas de morbi-mortalidad por cáncer cervical (68,69).

La detección temprana de una infección por VPH es fundamental para prevenir el desarrollo de CCU; el test de Papanicolaou fue introducido por el patólogo George Papanicolaou, en 1949 antes de que se conociera la causa del CCU (70), y desde entonces el método ha sido considerado como un método eficiente de tamización, que pone en evidencia cambios en las células a un costo bajo y de fácil acceso (71).

El test de Papanicolaou o Citología cervical consiste en la extracción de células de CU, y busca detectar anomalías que puedan progresar o convertirse en CCU si no son tratadas a

tiempo, el diagnóstico citológico tiene en cuenta propiedades y características de las células de epiteliales del CU, permitiendo diagnosticar las lesiones inespecíficas y específicas de infecciones por Trichomonas, Chlamydias, Herpes Virus, VPH y otras, así como las neoplasias intraepiteliales cervicales en sus diferentes grados; es una prueba de tamización, por lo tanto no puede considerarse diagnóstica, es decir, detecta células anormales sospechosas de malignidad o de CCU, pero debe confirmarse en cualquier caso el diagnóstico con una colposcopia o una biopsia (72,73).

El método, presenta limitaciones que se relacionan con lo engorroso que resulta hacer la lectura de las muestras, presentando por consiguiente falsos negativos. Además de la baja sensibilidad, también se puede ver involucrado el personal capacitado para la toma de las muestras y el transporte de las mismas (74,75).

El error humano constituye de las principales amenazas para una correcta interpretación. Pueden producirse resultados falsos negativos cuando las células no se diseminan de manera uniforme en el portaobjetos, cuando hay contaminación de la muestra ya que no permite diferenciar las células anormales; además, si se expone demasiado al aire antes de fijar la lámina, las células cervicales pueden distorsionarse. Se han reportado tasas de falsos negativos de 20 a 30% (71).

Para la obtención de una muestra citológica en condiciones óptimas es necesario que la mujer no se encuentre con la menstruación y en 48 horas anteriores no haberse realizado duchas vaginales o insertado óvulos. La zona de transformación es donde más frecuentemente se origina el CCU por lo que debe ser el sitio de toma de la muestra, al visualizar el CU y recolectar la muestra por medio de un cepillo endocervical o una espátula es necesario realizar el extendido en

una lámina previamente rotulada con los datos del paciente, y fijarse inmediatamente con spray fijador (76).

Para el procesamiento de la muestra es necesario realizar la tinción de Papanicolaou con el que se busca obtener contraste entre el núcleo y el citoplasma de las células, utilizando agua, alcohol etílico a diferentes concentraciones, colorantes, acetona y xilol con el propósito hidratar las células, prepararlas para la tinción y colorear los componentes celulares. Una vez observada la lámina, se realiza la interpretación de los hallazgos para dar un informe preciso (76).

3.9 Reacción en cadena de la Polimerasa para la detección de VPH:

La utilización de técnicas moleculares como PCR, detectan ADN de VPH y específicamente VPH de alto riesgo, y cuentan con un elevado valor en programas de tamización para la prevención de CCU, en mujeres con lesiones histológicas que puedan avanzar a carcinomas o lesiones de alto grado, por lo que estas pruebas en conjunto con la citología disminuyen el costo de cribado para CCU y son una herramienta útil para la prevención de CCU (77).

PCR es una técnica que se basa en el uso de dos cebadores que reconocen una determinada secuencia complementaria en la muestra de ADN analizar, por lo que son alargados por la acción de un ADN polimerasa, esta técnica se basa en tres pasos esencialmente como es la desnaturalización del ADN, la hibridación de los oligonucleótidos y la síntesis del nuevo producto de ADN (amplicon) a partir de los cebadores (78).

Un método basado en PCR diseñó cebadores consenso a partir de la secuencia de los marcos de lectura ORF E6 y E7 y el gen L1, han permitido ser muy adecuados para determinar una gran variedad de tipos de VPH debido a que los ORF E6 y E7 y el gen L1 son conservados en los diferentes tipos de VPH (79,80).

Las pruebas de ADN para los tipos de VPH – HR en muestras de tejido cervical contienen una sensibilidad mayor al 90% para detectar neoplasias cervicales de grado dos, pero presenta una limitación ya que esta es menos específica que la citología, al realizarse un estudio con la técnica de PCR en biopsias de cuello uterino, se observó infección por VPH en un 73.1% de casos donde los más frecuentes eran VPH 16, 18, 45, 33, 45, 31, 52, 39 y 35 (81).

La sensibilidad y especificidad de la PCR depende principalmente de factores como el tamaño de fragmento amplificado y la capacidad de detectar múltiples tipos virales, muchos ensayos de PCR utilizan cebadores dirigidos a la región del gen L1 la cual es la más conservada entre los tipos de VPH, destacando el uso de oligonucleótidos GP5+/6+ y MY (82,83).

3.10 PCR en tiempo real empleando plataforma cobas

Cobas® 4800 HPV, es un sistema automatizado de PCR en tiempo real, que permite detectar 14 genotipos de VPH de alto riesgo (84) en un único análisis y relacionar estos resultados con los estudios de citología anormales para conocer el grado de alteración citológica con el genotipo de VPH (85).

Esta prueba cualitativa detecta separadamente los tipos 16 y 18, además de otros doce genotipos de alto riesgo 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 (85,86), además ayuda a

realizar el proceso de tamización para identificar mujeres en situación de riesgo antes de la aparición del cáncer o lesiones cervicouterinas precancerosas, lo cual, es una estrategia importante de prevención (87).

Cada vez son más países que incorporan la tamización mediante la detección de ADN de VPH a sus programas nacionales de prevención del CCU, como prueba previa a la citología. Según el estudio clínico ATHENA se demostró que el cribado con la prueba de Cobas® 4800 HPV detecta más lesiones cervicouterinas de alto grado que la prueba de Papanicolaou (citología cervicovaginal) por sí sola (87).

La prueba de Cobas® 4800 HPV, aprobada por la FDA (Food and Drug Administration: Administración de Medicamentos y Alimentos), es un ensayo que proporciona resultados seguros, sin reactividad cruzada con los tipos de VPH de bajo riesgo; utiliza B-globina como control interno que ayuda a reducir el problema de los falsos negativos (88).

4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de investigación

Se realizó un estudio de tipo transversal descriptivo con el fin de determinar la frecuencia del Virus de Papiloma Humano en muestras emparejadas de tejido cervical y orina de mujeres de los municipios de Leticia y Puerto Nariño del departamento del Amazonas.

4.2. Población

El presente estudio se desarrolla dentro del marco del proyecto de regalías “DESARROLLO DE UN PLAN DE MANEJO PARA EL CONTROL DEL CANCER DE CERVIX EN EL DEPARTAMENTO DEL AMAZONAS”. Para la realización de este trabajo se utilizaron 216 muestras cervicales y 216 muestras de orina, obtenidas de mujeres entre 15 – 74 años, que manifestaron haber iniciado su vida sexual, pertenecientes a los municipios de Leticia y Puerto Nariño del departamento de Amazonas en el periodo comprendido de Enero – Diciembre de 2016.

4.3. Técnicas y procedimientos

De las mujeres que aceptaron participar, se obtuvieron dos tipos de muestra, la primera correspondiente a una muestra de orina y una segunda, obtenida a partir de tejido cervical extraída por medio del test de Papanicolaou o citología vaginal; con el propósito de identificar la presencia de VPH por medio de técnicas moleculares como PCR convencional.

Las muestras de tejido cervical y de orina fueron recolectadas en el Hospital San Rafael de Leticia, de las diferentes comunidades denominadas, Barrio Nuevo, Caballo Cocha, Jose Maria Hernandez, Km 11, Km 12, Km 18, Km 6, San Antonio de los Lagos, San Juan Bosco, San Juan de los Parentes, Macedonia, Patrullero, Puerto Esperanza, Puerto Nariño y San Martin de Amacayacu establecidas en el proyecto mencionado y que aceptaron participar en el marco del proyecto de regalías “DESARROLLO DE UN PLAN DE MANEJO PARA EL CONTROL DEL CANCER DE CERVIX EN EL DEPARTAMENTO DEL AMAZONAS”. Los medios de toma de muestras y conservación fueron proporcionados por la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

4.3.1. Consideraciones éticas

De acuerdo a la Resolución, expedida por el Ministerio de Salud, número 008430 de octubre 4 de 1993, artículo 11, numeral b, este proyecto se considera como una investigación con riesgo mínimo.

Todos los datos obtenidos serán manejados con carácter confidencial y estarán bajo la ley de protección de datos personales (Ley 1581 de 2012), enmarcados dentro de la Línea de Investigación de Epidemiología molecular.

4.3.2. Toma de muestra de orina

Se obtuvieron dos muestras de orina por cada una de las participantes, recolectadas por ellas mismas en un recipiente estéril de frasco con tapa rosca. Como recomendación se indicó que fuera la primera orina de la mañana después realizar un aseo genital, al ser la más concentrada, y la recolección se realizó antes del examen citológico.

Cada recipiente se marcó con datos básicos de la paciente como el nombre y documento de identificación. Teniendo en cuenta, que por cada paciente se obtuvieron dos muestras de orina, uno de los frascos fue utilizado para realizar un parcial de orina en el laboratorio clínico del hospital, y el otro frasco de muestra fue almacenado a 4°C mientras era enviada a la FIDIC para realizar los estudios moleculares de identificación de VPH.

4.3.3. Toma de muestra cervical

Para la toma de muestra de tejido cervical, en el hospital y/o centro de salud se le indicó el procedimiento que se realizó a cada mujer del estudio, luego se le pidió que se ubicara boca arriba en la camilla, posterior, se inició insertando un espéculo en la vagina, lo que permite abrir la cavidad vaginal y observar al fondo el cuello del útero, no obstante, con una pequeña espátula y un cepillo se realiza un suave raspado en el interior y en la parte externa del cuello de útero permitiendo la toma de varias muestras.

Para obtener la mayor seguridad, confiabilidad y precisión de los resultados, se realizó una toma cervical en la cual se tomaron tres muestras de tejido cervical. La primera de estas se envió para su análisis con kit comercial por la técnica COBAS ® 4800 de Roche Molecular Systems para la identificación de VPH en muestras de cuello uterino a un laboratorio externo, la cual primero llegó a la FIDIC, se almaceno en medio de transporte Cobas PCR Cell Collection Media.y de allí fue remitida a un laboratorio externo “SIPLAS” contratado por FIDIC.

La segunda muestra de tejido cervical obtenida se derivó al Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) para los respectivos estudios moleculares por medio de PCR convencional. Y la tercera muestra, fue usada para el análisis citológico (extendido para test de Papanicolaou realizado por el profesional de la salud encargado de la atención de las mujeres en los servicios de salud de Leticia y Puerto Nariño).

Posteriormente, las muestras a procesar por PCR convencional se almacenaron en Etanol al 95% como medio de transporte. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20°C mientras eran procesadas por la FIDIC y enviadas para identificación molecular a un laboratorio externo.

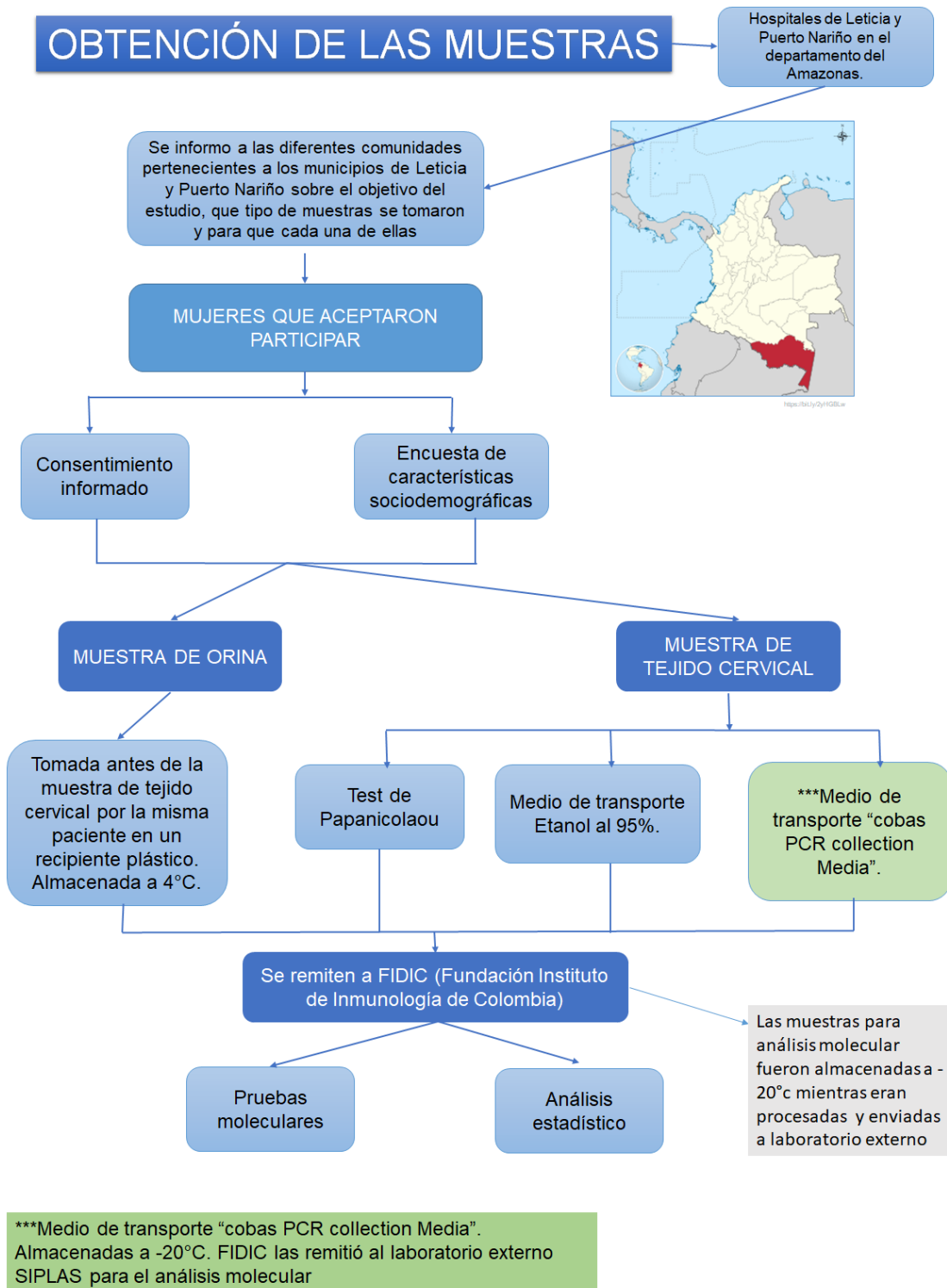


Figura 3. Obtención de muestras.

4.3.4. Criterios de inclusión

Las mujeres del estudio deben tener entre 15 – 74 años, a su vez debe ser población femenina que haya iniciado vida sexual activa, que participen a cualquier servicio de salud ofrecido por los hospitales de Puerto Nariño y Leticia en el departamento del Amazonas, y hayan diligenciado el respectivo consentimiento informado.

La población femenina que participó en este estudio pertenecía a las diferentes comunidades denominadas, Barrio Nuevo, Caballo Cocha, Jose Maria Hernandez, Km 11, Km 12, Km 18, Km 6, San Antonio de los Lagos, San Juan Bosco, San Juan de los Parentes, Macedonia, Patrullero, Puerto Esperanza, Puerto Nariño y San Martin de Amacayacu de la zona, a su vez fueron aceptadas en el estudio mujeres que provenían de distintos países como Brasil y Perú, por ultimo fueron aceptadas mujeres en estado de embarazo.

4.3.5. Criterios de exclusión

No podrán participar en el estudio mujeres:

- Que presenten sangrado a nivel del útero al momento de la toma de muestra.
- Que tengan relaciones sexuales los tres días anteriores a la toma de la citología
- Que hayan aplicado óvulos, duchas o cremas vaginales ya que esto interfiere con el resultado del examen
- Que tengan la menstruación, sin embargo, luego de tres días de cesar el periodo menstrual podrán participar en la toma de la citología.

4.4. Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN se emplearon dos protocolos comerciales para cada uno de los dos tipos de muestra de orina y muestras de tejido cervical. El ADN extraído será utilizado en la técnica de PCR.

Para la extracción de ADN en muestras de tejido cervical se utilizó el Kit comercial “Quick Extract Solution 1.0”. Por otro lado, para el proceso de extracción de ADN en muestras de orina se utilizó el Kit comercial “Quick-DNA Urine Kit”. Ambos protocolos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Detección de VPH por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR)

Posteriormente, las muestras extraídas se sometieron a PCR convencional con el fin de determinar la presencia de VPH.

Con el fin de determinar la calidad de la muestra, se amplificó un fragmento del gen de la B-globina, cuya presencia evalúa la integridad del ADN, utilizando los cebadores GH20/PC04, con un producto amplificado de 268pb (71-68-84-89). Las condiciones de PCR estandarizadas para este trabajo se encuentran descritas en la **Tabla 1**.

Fase de PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	
Alineamiento	55 °C	1 min	35
Extensión	72 °C	2 min	
Elongación	72 °C	7 min	1

Tabla 1. Condiciones de temperatura para ensayo PCR de B – globina. (90,91,92)

Después de evaluar la calidad de la muestra, se determinó la presencia de ADN viral, por tanto las muestras que dieron un resultado positivo para el gen constitutivo de B - globina, fueron sometidas a tres protocolos para la detección genérica de VPH, empezando con dos de ellos, los sets de cebadores GP5+/GP6+ y MY09/MY011, dirigidos a la proteína L1, la principal proteína de la cápside viral, obteniendo un producto amplificado de 150pb y 450pb respectivamente (69,90); y posteriormente, se usaron los cebadores pU-1M/pU-2R dirigidos a las proteínas E6 y E7 (70,91), del cual se obtuvo un producto entre 228-268pb (se utilizó un set de cebadores que permite la identificación tanto de E6 y E7, el cual arroja un producto amplificado dependiente del tipo de VPH encontrado), determinando si el VPH identificado se encontraba dentro del grupo de Alto riesgo (71,33).

Ensayo	Fase de PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos
GP5+/GP6+	Desnaturalización inicial	94°C	10 min	1
	Desnaturalización	94°C	30 seg	
	Alineamiento	42 °C	30 seg	35
	Extensión	72 °C	30 seg	
	Elongación	72 °C	7 min	1
MY09/MY011	Desnaturalización inicial	94°C	5 min	1
	Desnaturalización	94°C	30 seg	
	Alineamiento	51 °C	45 seg	40
	Extensión	72 °C	45 seg	
	Elongación	72 °C	7 min	1
pU-1M/pU-2R	Desnaturalización inicial	94°C	10 min	1
	Desnaturalización	94°C	1 min	
	Alineamiento	53 °C	2 min	30
	Extensión	72 °C	2 min	
	Elongación	72 °C	7 min	1

Tabla 2. Condiciones de PCR convencional para tres protocolos de detección genérica de VPH (92,93).

Las muestras en que se demostró la infección por VPH se les determinó el genotipo de VPH de alto riesgo mediante el uso de cebadores específicos para los tipos VPH 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, y 58, simultáneamente, con el fin de identificar el tipo o tipos virales presentes.

Ensayo	Detección	Cebadores y Secuencia	Tamaño del fragmento
B-globina	Calidad de ADN	PC03: ACACAACCTGTGTTCACTAGC PC04: CAACTTCATCCACGTTCCACC	268pb
Presencia de VPH	Proteína L1	GP5+:TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC GP6+:GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	150pb
	Proteína L1	MY09: CGTCCMARRGGAWACTGATC MY011: GCMCAGGGWCATAAYAATGG	450pb
	Proteína E6/E7	pU-1M: TGTCAAAAACCGTTGTGTCC pU-2R: GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	228-268pb
Tipos virales	VPH 16	VPH16 (D): TCC TGC AGG TAC CAA TGG GGA AGA GG VPH16 (R): TGC CAT ACC CGC TGT CTT CGC TTT	78pb

específicos	VPH 18	VPH18 (D): AAC AGT CCA TTA GGG GAG CGG CTG GA VPH18 (R): TGC CGC CAT GTT CGC CAT TTG	202pb
	VPH 31	VPH31 (D): GCG GTC CAA ACG CTC TAC AAA ACG CAC T VPH31 (R): GCA GGG GCA CCA ACA TCA ACA ATT CCA	81pb
	VPH 33	VPH35 (D): ACA CAG AGG CAG CCC GGG CAT TGT TT VPH35 (R): CAC GGG TTT GCA GCA CGA TCA ACA	212pb
	VPH 45	VPH45 (D): TGT TGG ACA TCA CAC CTA CCG TGG A VPH45 (R): TCC GTA CCT GAC CCA GAA GAT GCA A	134pb
	VPH 51	VPH51 (D): CAA CTA GCA ACG GCG ATG GAC TG VPH51 (R): CTG CTT CGC GGG CTG ACT AGA A	299pb
	VPH 52	VPH52 (D): GCT GTT CGT GCT GGT GCT TTT GCT A VPH52 (R): CAG TTA CAG GGG GAC GAA TGG TGG A	517pb
	VPH 58	VPH58 (D): ACC ACC GAG GCC ACC AAC AAC GAA AGT VPH58 (R): CGT GGT CTA CTG TCC ACG GCG CAG TCT	109pb

Tabla 3. Descripción de cebadores y producto amplificado (92).

Se utilizaron controles positivos y negativos para cada caso. Como controles positivos fueron empleados muestras previamente identificadas para cada tipo viral, que habían sido secuenciadas para la confirmación del tipo viral, y como control negativo se utilizó agua libre de DNasa y RNasa.

4.6. Electroforesis:

Los genotipos de VPH se identificaron por electroforesis en geles de agarosa. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2, 2.5 y 3% (la concentración de agarosa varía dependiendo del tamaño del fragmento de VPH que se va identificar), mediante corrido electroforético a 100V por 18 minutos aproximadamente, con buffer TAE 1X y teñidos con SYBR Safe 1X (Invitrogen). Posteriormente, expuestos a luz ultravioleta para registro fotográfico. Los geles se prepararon con un porcentaje de agarosa de acuerdo al producto amplificado con el fin de visualizar mejor el corrido.

4.7. PCR en tiempo real empleando cobas ® 4800

Para la detección de VPH en las 216 muestras de tejido cervical de mujeres amazonenses, se optó por realizar una toma de muestra de cérvix con cito cepillo a cada una de las pacientes, las cuales se enviaron a SIPLAS un laboratorio externo para su análisis en el medio de transporte Cobas – PCR Cell Collection Media. Estas muestras serán analizadas por la técnica COBAS ® 4800 de Roche Molecular Systems, la cual es una de las pruebas mejor garantizadas por la FDA para la detección de VPH.

4.8. Análisis estadístico

Un análisis de regresión logística binomial fue empleado para modelar la asociación entre los tipos de infección de VPH (tomada como variable dependiente) y los distintos factores de riesgo (edad, edad de inicio de relaciones sexuales, número de compañeros sexuales, método anticonceptivo, exposición a agentes con potencial carcinógeno, aplicación de la vacuna de VPH) tomados como variables independientes dentro del modelo. Para los tipos de infección fueron sumadas todas las infecciones detectadas por cualquiera de los dos métodos (PCR y COBAS) y las dos fuentes de muestra (cérvix y orina), la infección por VPH fue definida como aquellas mujeres con identificación para cualquier tipo viral, la infección por VPH-16 y -18 definidas como aquellas mujeres con detección solo para estos tipos virales, finalmente, la infección por

VPH de alto riesgo aquella ocurrida por los tipos virales VPH- 31, -33, -45, -51, -52 y -58. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa STATA14®.

5. RESULTADOS

5.1. Características de la población

216 mujeres cumplieron con los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio mediante un consentimiento informado, después de obtener información de su rol de participación en el proyecto. El rango de edad de las mujeres en su mayoría colombianas (80,56%; n=174), seguidas las mujeres de nacionalidad brasileña (3,24%, n=7), mujeres peruanas (1,39% n=3) y 32 de ellas de las cuales no se obtuvo datos de su nacionalidad (14,81%); el rango de edad de las mujeres estuvo entre 15 y 74 años (edad promedio 38,2 años; DS: 12,3), la mayoría de mujeres se encontró en el rango de edad entre 27 y 40 años. **Tabla 4**

En la tabla 4. Se describe la cantidad de mujeres que presentan determinada característica con su respectivo porcentaje, en donde se evidenciaron características sociodemográficas las cuales son tomadas como factores de riesgo para la progresión de CCU, tales como, el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, en donde se mostró que el 34,72% n = 75 iniciaron vida sexual antes de los 15 años de edad, por otro lado, el número de compañeros sexuales mayor a 3 (27,77 n= 60), se posicionó en segundo lugar en las mujeres del estudio, a su vez, el número de partos mayor a 3 (46,3 n= 100) se disponen como factores de riesgo importantes presentes en el estudio.

Por otra parte, características como el nivel económico (35,65 n= 77), nivel educativo (secundaria) 54,42 n= 117 se relacionan con poca accesibilidad a servicios de salud y desinformación sobre temas relacionados con prevención y promoción de CCU.

Característica		
Edad Promedio	38,2 años DS: 12,3 [15 a 74]	
Grupo étnico	n	(%)
Blanca	15	7,43
Indígena	77	38,1
Mestiza	106	52,4
Negra	4	1,98
Número de familiares con que convive		
1-3	78	36,1
4-5	74	34,2
Mayor a 5	64	29,6
Ingresos mensuales		
Entre 0 Y \$300.000	77	35,65
Entre \$300.001 Y \$600.000	13	6,02
Entre \$600.001 Y \$1'000.000	32	14,81
Más de 1'000.000	22	10,18
Sin Dato	72	33,33
Nivel de escolaridad		
Analfabeta	3	1,40
Primaria	53	24,65
Secundaria	117	54,42
Técnica	21	9,77
Universitaria	21	9,77
Ha estado expuesto a		
Carbón	9	4,17
Leña	50	23,14
Químicos	112	51,85
Ninguno	43	19,9
Sin Dato	2	0,93
Ha fumado		
Si	7	3,24
No	199	92,13
Sin Dato	10	4,63
Edad inicio relaciones sexuales		
Menor a 15	75	34,72
16-17	68	31,48
Mayor a 18	73	33,8

Número de compañeros sexuales		
1	78	36,11
2	47	21,76
3	25	11,57
Más de 3	60	27,77
Sin Dato	6	2,78
Menopausia		
Si	35	16,21
No	173	80,09
Sin Dato	8	3,70
Número de partos		
Ninguno	23	10,6
1-2	93	43,0
Mayor a 3	100	46,3
Antecedentes de abortos		
No	142	65,7
Si	74	34,2
Citología previa		
Primera vez	22	10,19
Si	192	88,89
Sin Dato	2	0,93
Resultado citología		
Anormal	38	17,59
Normal	120	55,56
Sin Dato	58	26,85
Nacionalidad		
Brasileña	7	3,24
Colombiana	174	80,56
Peruana	3	1,39
Sin Dato	32	14,81
Vacuna VPH		
Si	31	14,35
No	165	76,39
Sin Dato	20	9,26
Método anticonceptivo		
Ninguno	140	64,8
Hormonal	55	25,4
Barrera	21	9,72
ITS		
Ninguna	211	97,69
Sífilis	2	0,93
VIH	3	1,39

Tabla 4. Descripción de las características sociodemográficas de la población estudiada.

5.2. Asociación entre los distintos tipos de infección

Razones de disparidad (ORs, por las siglas en inglés de *Odds ratio*), con su correspondiente IC 95%, fueron utilizadas para medir la fuerza de asociación entre los distintos tipos de infección (infección por VPH, infección por VPH-16 y -18 e infección por VPH de alto riesgo) y los factores riesgo. Los resultados mostraron una asociación positiva para mujeres que reportaron inicio de vida sexual después de los 18 años e infección por VPH (aOR: 1,19 IC95% 1,01– 1,39) y aquellas con infección por VPH-16 y -18 (aOR: 1,40 IC95% 1,11– 1,76), en cuanto a las mujeres con infección por VPH de alto riesgo una asociación positiva se observó para aquellas con más de tres compañeros sexuales (aOR: 2,76 IC95% 1,03– 7,42) (Tabla 5). En contraste menor asociación fue hallada en mujeres entre 27 a 40 años e infección por VPH (aOR: 0,37 IC95% 0,14-0,99), infección por VPH-16 y -18 (aOR: 0,22 IC95% 0,56– 0,89), y finalmente infección por VPH de alto riesgo (aOR: 0,20 IC95% 0,68– 0,59) (**Tabla 5**).

Variable	Infección por VPH		Infección por VPH-16 y -18		Infección por VPH de alto riesgo ^a	
	OR ajustado ^b	95%CI	OR ajustado ^b	95%CI	OR ajustado ^b	95%CI
Edad, años	Referencia		Referencia		Referencia	
≤ 26	Referencia		Referencia		Referencia	
27 a 40	0,37	0,14-0,99	0,22	0,56-0,89	0,20	0,68-0,59
40 a 50	0,62	0,19-1,89	0,29	0,05-1,50	0,46	0,13-1,56
≥ 50	0,58	0,15-2,21	0,17	0,02-1,18	0,49	0,11-2,06
Edad primera relación sexual	Referencia		Referencia		Referencia	
< 18 años	Referencia		Referencia		Referencia	
≥ 18 años	1,19	1,01-1,39	1,40	1,11-1,76	1,17	0,98-1,40
Número compañeros sexuales	Referencia		Referencia		Referencia	
1	Referencia		Referencia		Referencia	
2	1,59	0,61-4,15	1,78	0,44-7,16	2,30	0,80-6,55
3	0,54	0,13-2,13	0,52	0,55-5,00	0,23	0,27-2,00
> 3	1,71	0,70-4,15	1,72	0,48-6,18	2,76	1,03-7,42
Método anticonceptivo	Referencia		Referencia		Referencia	
Ninguno	Referencia		Referencia		Referencia	
Hormonal	1,24	0,50-3,08	0,53	0,12-2,17	1,20	0,44-3,28
Barrera	1,92	0,63-5,81	0,65	0,11-3,61	2,79	0,85-9,06
Exposición a agentes con potencial carcinógeno^c	Referencia		Referencia		Referencia	
No	Referencia		Referencia		Referencia	
Si	1,06	0,44-2,52	1,71	0,45-6,39	1,79	0,64-5,00
Aplicación de la vacuna de VPH	Referencia		Referencia		Referencia	
No	Referencia		Referencia		Referencia	
Si	1,17	0,45-3,04	0,57	0,11-2,86	1,05	0,36-3,08

Tabla 5. Regresión logística de los factores de riesgo de las mujeres incluidas en el estudio con el tipo de infección por VPH.

Valores en negrita fueron estadísticamente significativo (P<0.05)

^a Como infecciones por VPH de alto riesgo se consideran aquellas positivas para VPH- 31, -33, -45, -51, -52 y -58.

^b OR ajustado por edad, edad de inicio de relaciones sexuales, número de compañeros sexuales, método anticonceptivo, Exposición a agentes con potencial carcinógeno, Aplicación de la vacuna de VPH.

^c Como agentes con potencial carcinógeno fueron tenidos en cuenta: carbón, leña o químicos

5.3. Frecuencia de VPH y tipos virales.

La frecuencia de la infección por VPH - HR fue de 41,59 (n= 89), considerándose como positivas aquellas mujeres con detección de VPH - HR en alguno de los tipos de muestra utilizados (de tejido cervical y orina) y aquellas muestras positivas para COBAS 4800. La frecuencia de infección por VPH - HR en muestras de tejido cervical fue de 14,35 (n = 31), en muestras de orina fue de 10,65 (n=23), y las muestras de tejido cervical enviadas para su estudio por medio de COBAS 4800 como test de referencia mostraron positividad del 16,59 (n = 35). (Figura 4)

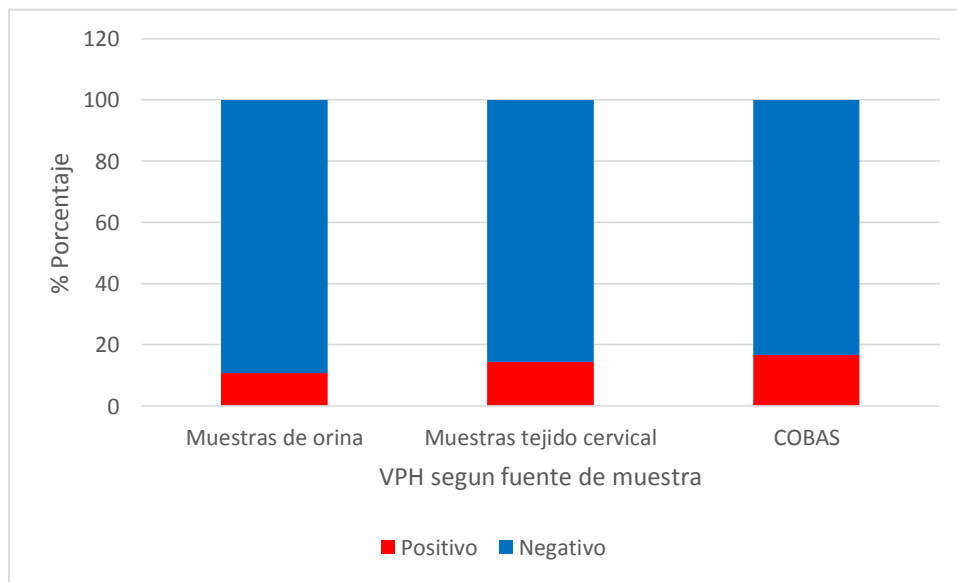


Figura 4. Acumulado de detección de VPH – HR en muestras de tejido cervical y orina.

Se detectaron 8 tipos de VPH-HR en muestras de orina y tejido cervical, donde la frecuencia obtenida de los tipos virales difiere con respecto al tipo de muestra utilizada para su detección, por lo que se evidenció en muestras de tejido cervical una mayor frecuencia de

detección para el tipo VPH 45 de 74,1 y VPH 16 de 40,7, por otra parte, en muestras de orina la mayor frecuencia fue de 56,5 y 47,8 para tipos de VPH 18 y 31 respectivamente. **(Figura 5).**

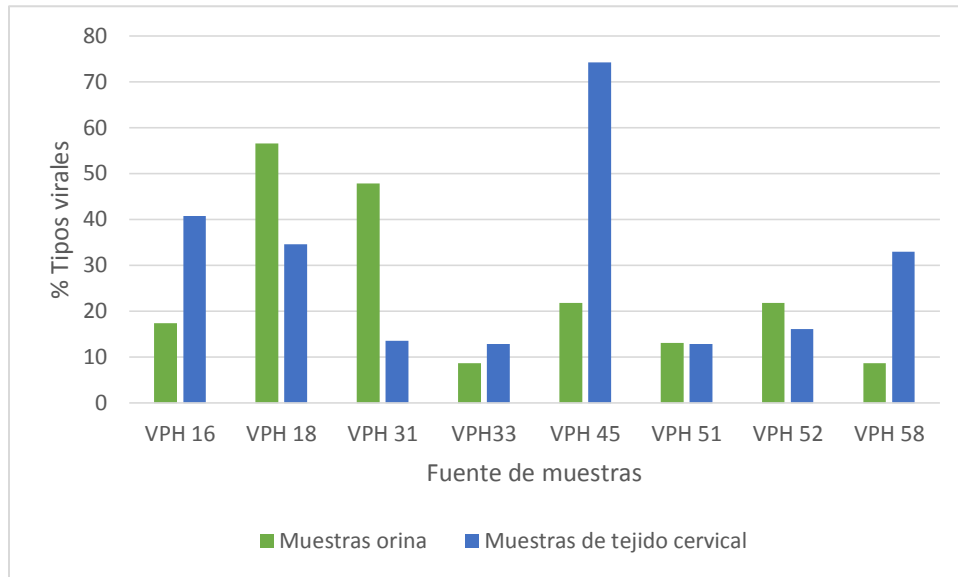


Figura 5. Frecuencia de la detección tipo específica de VPH en las dos fuentes de muestra utilizadas en el estudio.

En la Figura 6. Se presenta la distribución de tipos VPH 16, 18 y VPH – HR en las diferentes muestras del estudio, donde al comparar su frecuencia se determinó la mayor frecuencia dada en COBAS, Orina y Cérnix de tipos VPH – HR, con un 88,57, 78,26 y 90,32 respectivamente, sin embargo, el tipo VPH 18 se ha identificado en un 56,52 (n =23) en muestras de orina siendo el de mayor frecuencia entre las diferentes muestras estudiadas.

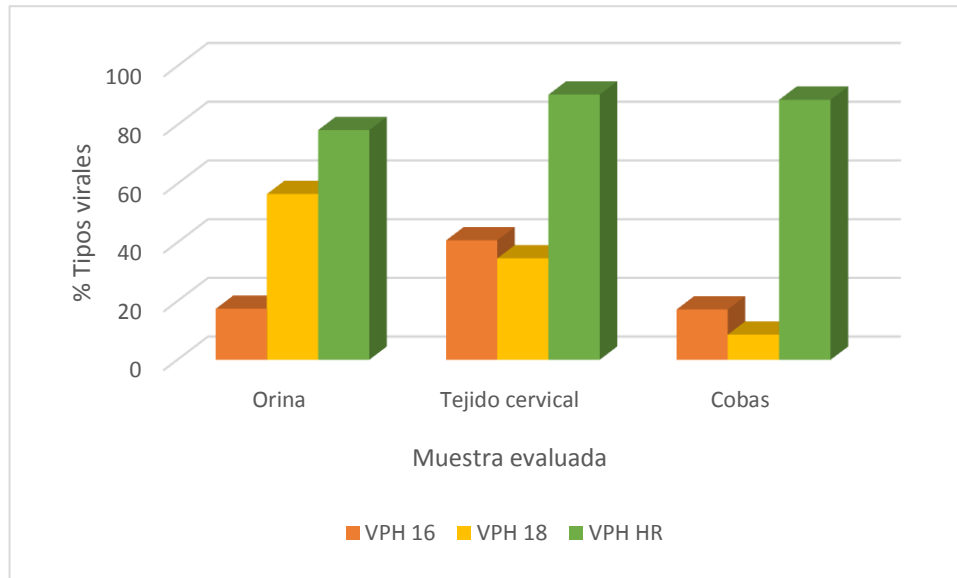


Figura 6. Frecuencia de VPH 16, 18 y VPH - HR según los dos tipos de muestra y controles de COBAS

4800.

5.4. Coinfección por otros tipos de VPH - HR en muestras de tejido cervical, y orina.

Al momento de determinar la presencia de VPH en muestras de orina, cérvix y COBAS, se detectó que algunas mujeres del estudio presentaban infecciones por 2 o más tipos de VPH, por lo cual al comparar las diferentes muestras arrojaron resultados, como que las muestras de tejido cervical contaban con la mayor frecuencia de coinfección por VPH con un 10,64, seguido de orina con un 5,55 y por último COBAS con un 2,31. Figura 7.

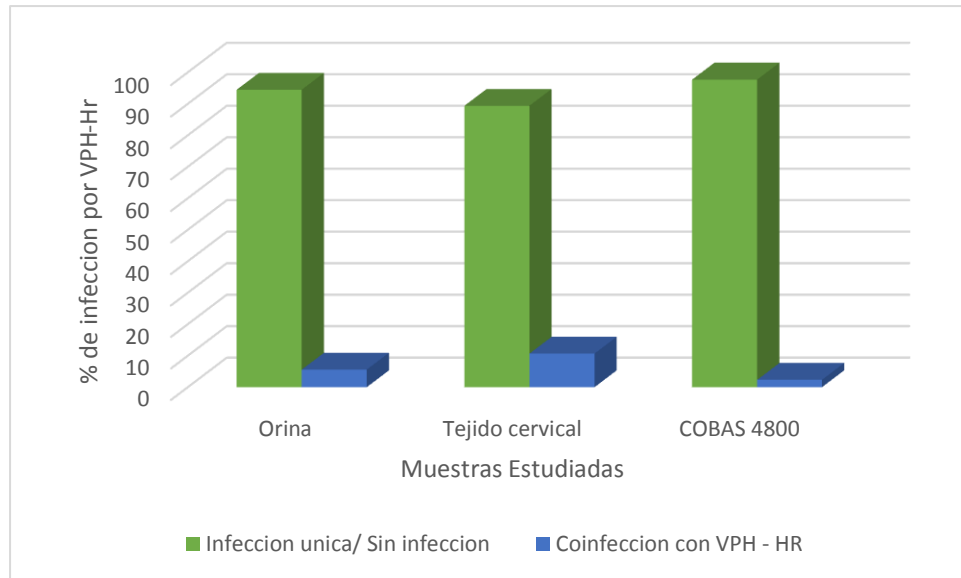


Figura 7. Coinfeccion con otros tipos de VPH - HR en muestras de tejido cervical, y orina

5.5. Comparación VPH - HR en muestras de tejido cervical, de orina, COBAS y resultado citología

	n	DETECCIÓN VPH EN ORINA		DETECCIÓN VPH EN MUESTRAS DE TEJIDO CERVICAL		DETECCIÓN VPH POR COBAS							
		Negativo		Positivo		Negativo		Positivo					
		n	%	n	%	n	%	n	%				
Citología normal	131	117	89,3	14	10,7	115	87,8	16	12,2	115	87,8	16	12,2
ASCUS	43	41	95,3	2	4,7	35	81,4	8	18,6	36	83,7	7	16,3
AGC	7	7	100	0	-	7	100	0	-	7	100	0	-
LEIBG	28	22	78,6	6	21,4	23	82,1	5	17,9	18	64,3	10	35,7
LEIAG	4	4	100	0	-	3	75,0	1	25,0	3	75,0	1	25,0
Total	213	191		22		183		30		179		34	

Tabla 6 Comparación de la detección de VPH - HR en orina, tejido cervical y cobas de acuerdo al hallazgo citológico (n= 213).

Fueron excluidas 3 muestras con resultado de citología insatisfactorio.

Abreviaciones: ASCUS: atipias en células escamosas de significado incierto; AGC: Atipias de Células Glandulares; LEIBG:

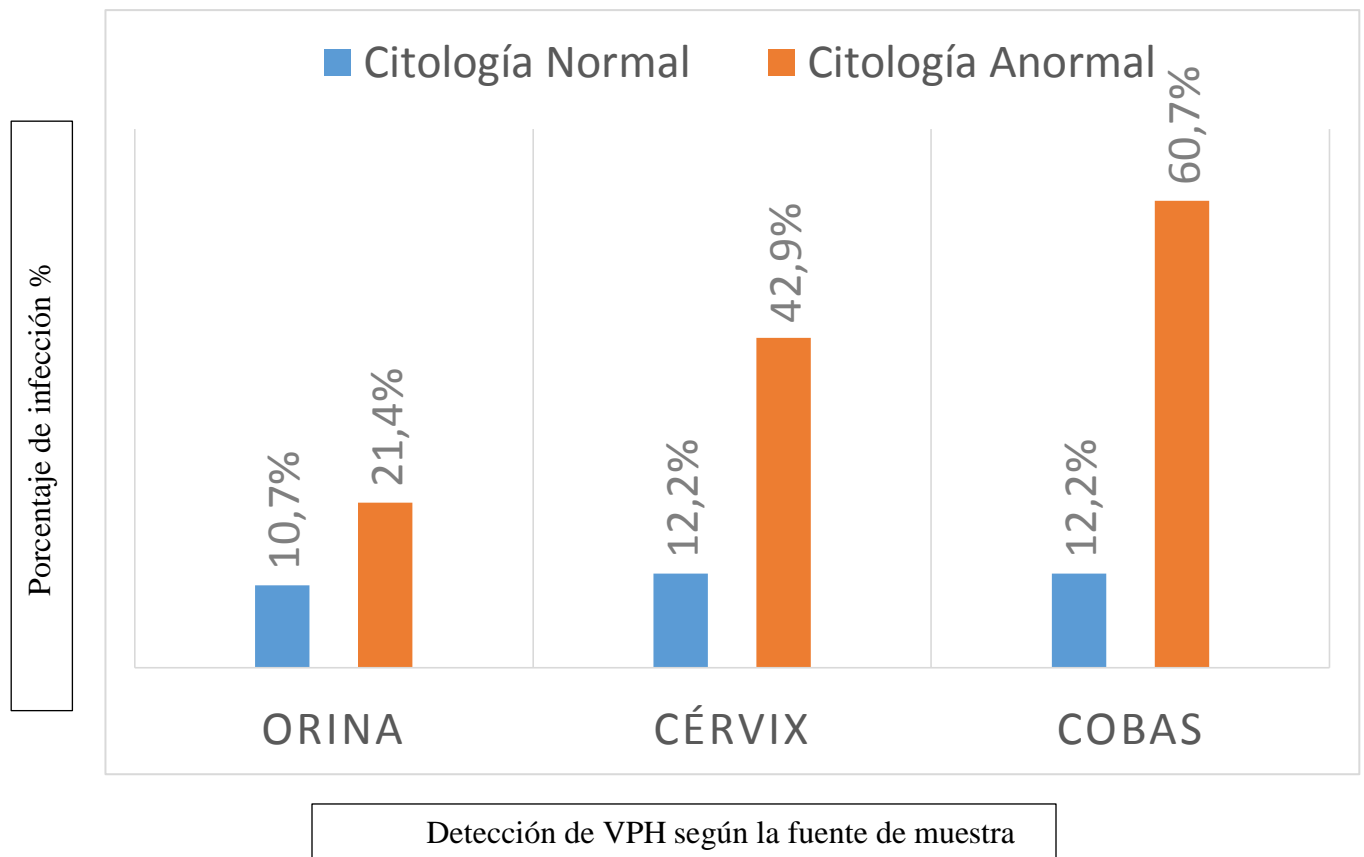
Lesión Intraepitelial de Bajo Grado; LEIAG: Lesión Intraepitelial de Alto Grado

Frente al resultado de citología, y la detección de VPH – HR en las diferentes muestras, se encontró que el 89,3(n=117) de muestras orina , el 87,8 (n=115) de muestras de tejido cervical y el 87, 8 (n=117) de muestras remitidas para prueba COBAS dieron negativas en la detección de VPH – HR con un resultado de citología normal, y el 10,7 (n=14), 12,2 (n=16) y 12,2 (n=16) en muestras de orina, tejido cervical y COBAS respectivamente fueron positivas para la detección de VPH – HR con un resultado normal en la citología, por otra parte, al comparar los resultados anormales se observó que de las 7 muestras con resultado AGC en citología todas estas fueron negativas en la detección de VPH – HR en muestras de orina, muestras de tejido cervical y COBAS. **Tabla 6.**

De manera, que al comparar el resultado anormal LEIBG , en donde de las 28 muestras con resultado LEIBG, 78,6 (n=22) son negativas para VPH – HR y 21,4 (n=6) son positivas para ADN de VPH – HR en muestras de orina, en muestras de tejido cervical el 82,1 (n=23) son negativas en la detección de VPH – HR y un 17,9 (n=5) obtuvieron un resultado positivo para detección de VPH – HR en muestras de tejido cervical, por ultimo al comparar COBAS y LEIBG el 64,3 (n=18) son negativas para la detección de VPH – HR y el 35,7 (n=10) fueron positivas para ADN de VPH – HR **Tabla 6.**

En el presente estudio los resultados de citología y la detección de VPH – HR en las diferentes muestras y prueba COBAS, se presentaron de la siguiente manera: en muestras de orina un 10,7 para VPH – HR obtuvo un resultado normal de citología y 9,8 con resultado anormal de citología, en muestras de tejido cervical el 17,1 presentaron citología anormal y un 12, 2 mostraron citología normal de VPH – HR positivo, en cuanto la comparación con prueba de COBAS el 22,0 mostro citología anormal con detección de VPH – HR positivo, y el 12,2 obtuvo un resultado normal en citología. **Figura 8.**

Figura 8. Frecuencia de la detección de VPH – HR en citología normal (n=131) y citología anormal (n= 82), de acuerdo a la fuente de muestra (orina y tejido cervical) y a la prueba de COBAS.



5.6. Características operativas de las pruebas

Para la evaluación de las características operativas de la prueba (PCR) utilizada en las muestras de tejido cervical y de orina en la determinación de la infección por VPH, donde la sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas, los valores predictivos positivo y negativo se muestran en la **Tabla 7**.

Test de Referencia	Identificación VPH	Sensibilidad% [95% CI]	Especificidad % [95% CI]	VPP [95% CI]	VPN [95% CI]
COBAS	Orina	13.6 [2.9 - 34.9]	83.1 [76.9 - 88.1]	8.6 [1.8 - 23.1]	89.2 [83.7 - 93.4]
	Cérvix	19.4 [7.5 - 37.5]	83.9 [77.7- 88.9]	17.1 [6.6-33.6]	85.8 [79.7- 90.6]
	Cérvix VPH 16	33.3 [4.3 - 77.7]	100.0 [54.1-100.0]	100.0 [15.8-100.0]	60.0[26.2- 87.8]
	Cérvix VPH 18	20.0 [0.5-71.6]	100.0 [59.0-100.0]	100.0 [2.5 -100.0]	63.6 [30.8-89.1]
	Cérvix VPH 31	100.0 [2.5- 100.0]	20.0 [0.5-71.6]	20.0 [0.5-71.6]	100.0 [2.5- 100.0]
	Cérvix VPH 33	100.0 [2.5- 100.0]	20.0 [0.5-71.6]	20.0 [0.5-71.6]	100.0 [2.5- 100.0]
	Cérvix VPH 45	80.0 [28.4-99.5]	0.0 [0.0-97.5]	80.0 [28.4-99.5]	0.0 [0.0-97.5]
	Cérvix VPH 51	0.0 [0 – 45.9]	84 [63.9 – 95.5]	0.0 [0.0 – 60.2]	77.8 [57.7 – 91.4]
	Cérvix VPH 52	100.0 [2.5-100.0]	20.0 [0.5 - 71.6]	20.0 [0.5 71.6]	100.0 [2.5-100.0]
	Cérvix VPH 58	100.0 [47.8-100.0]	28.6 [3.7-71.0]	50.0 [18.7-81.3]	100.0[15.8-100.0]
	Orina VPH 16	0 [0 – 70.8]	78.9 [54.4 - 93.9]	0 [0 - 60.2]	83.3 [58.6 - 96.4]
	Orina VPH 18	66.7 [9.43 - 99.2]	47.4 [24.4 - 71.1]	16.7 [2.09 - 48.4]	90 [55.5 - 99.7]
	Orina VPH 31	0 [0 - 70.8]	47.4 [24.4 - 71.1]	0 [0 - 30.8]	7 [42.8 - 94.5]
	Orina VPH 33	0 [0 - 70.8]	89.5 [66.9 - 98.7]	0 [0 - 84.2]	85 [62.1 - 96.8]
	Orina VPH 45	0 [0 - 70.8]	73.7 [48.8-90.9]	0 [0 - 52.2]	82.4 [56.6 - 96.2]
	Orina VPH 58	0 [0 - 70.8]	89.5 [66.9 - 98.7]	0 [0 - 84.2]	85 [62.1 - 96.8]
	Orina VPH 52	33.3 [.84 - 90.6]	78.9 [54.4 - 93.9]	20 [.505 - 71.6]	88.2 [63.6 - 98.5]
	Orina VPH 51	33.3 [.84 - 90.6]	89.5 [66.9 - 98.7]	33.3 [.84 - 90.6]	89.5 [66.9 - 98.7]

Tabla 7. Características operativas de las pruebas en las muestras de orina, muestras de tejido cervical y COBAS 4800

La sensibilidad de muestras de orina arrojó un 13.6, con un 8.6% de valor predictivo positivo (VPP), y su especificidad de 83.1 con un valor predictivo negativo (VPN) de 89.2. En cuanto la detección de VPH en muestras de tejido cervical, la sensibilidad es de un 19.4 con un VPP de 17.1, y arrojo una especificidad de 83.9% con un 85.9% en el VPN.

La detección de ADN de los 8 tipos virales estudiados tanto para muestras de orina, como de muestras de tejido cervical, donde la sensibilidad en muestras de orina para los tipos VPH – HR no fue representativa a excepción de VPH 18 el cual conto con un 66,7, por otro lado, la mayor especificidad se encontró en VPH 33, VPH 58 y VPH 51 con un 89,5 para estos VPH – HR.

En cuanto, para las muestras de tejido cervical en términos de sensibilidad los tipos VPH 31, VPH 33, VPH 52 y VPH 58 arrojaron resultados favorables del 100%, y la mejor especificidad fue dada en VPH 16 y VPH 18 del 100%.

6. DISCUSIÓN

Según el informe revelado en marzo de 2018 por La liga colombiana Contra el Cáncer, donde manifestó que aproximadamente 4.462 mujeres al año han sido diagnosticadas con CCU, de las cuales 1861 mueren a causa de esta enfermedad, siendo la segunda causa de muerte luego del cáncer de mama en el género femenino en Colombia. Por lo que sigue siendo un problema de salud pública, por tanto, el director científico de la liga, Carlos Castro, hace énfasis en la detección temprana de esta enfermedad (94).

Hoy en día se sabe que el CCU está vinculado con la presencia crónica de VPH, y sus tipos virales con propiedades oncogénicas, tales como los tipos 16 y 18 (95). De esta manera en la actualidad la OMS recomienda un enfoque integral frente a CCU, por medio de la educación, sensibilización de la comunidad, la vacunación y la detección de mujeres en riesgo (8).

En países en desarrollo, sin embargo, sigue siendo difícil conseguir que las mujeres, sobre todo en las áreas rurales, se sometan con regularidad a una citología. La falta de acceso a servicios de salud, el temor de las mujeres al examen y la ignorancia acerca de la utilidad de la prueba son factores que podrían explicar la frecuencia con que se efectúan este tipo de pruebas en algunas partes del mundo y del país (95).

Estudios llevados a cabo en nuestro país indican que existe un incremento en la infección por distintos tipos de virus en función de la edad, llegando incluso a ser cercana al 50% en mujeres de 19 años (96). La detección de la infección por VPH tiene una relación temporal con el inicio de las relaciones sexuales, lo cual explica el primer pico de detección en mujeres menores

de 18 años (97). Adicionalmente, estudios indican que en mujeres con inicio de vida sexual activa en edades tempranas pueden presentar un incremento en el riesgo para adquirir infecciones por tipos de VPH alto riesgo y el desarrollo de lesiones a nivel de cuello uterino, esto debido en parte a la exposición temprana a tipos virales con potencial oncogénico, a la influencia hormonal de los esteroides sobre la infección viral y la respuesta inmune del hospedero a joven edad (98).

En aquellas mujeres que reportaron más de tres compañeros sexuales (≥ 3) se encontró una asociación positiva con las infecciones por tipos de VPH de alto riesgo, teniendo en cuenta que la principal ruta de transmisión de dichas infecciones la constituyen antecedentes de comportamiento sexual, el inicio temprano de la vida sexual y el número de compañeros sexuales, también, el no utilizar preservativo, y otras infecciones de transmisión sexual, pueden contribuir en la continua circulación de los tipos virales de VPH (99,100).

La edad es considerada como un importante factor asociado a las dinámica de las infecciones por VPH, puesto que las infecciones virales ocurren con mayor frecuencia en mujeres jóvenes sexualmente activas con edades entre 18 a 25 años, mostrando una tendencia al descenso de la prevalencia después de los 30 años, no obstante cuando las mujeres entran en la menopausia suele observarse un aumento en la frecuencia de la infección por este virus, en parte debido a la reactivación de infecciones latentes o al cambio hormonal producido que favorece la replicación del VPH (101,102), esto concuerda con los resultados obtenidos donde se observa menor asociación a los distintos tipos de infección evaluados y aquellas mujeres con edades entre 27 a 40.

La utilización de otras muestras, como la orina, es una alternativa que ha sido utilizada para el diagnóstico de otras enfermedades de transmisión sexual como las producidas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* (103).

El uso de muestras de orina en el programa de tamización de CCU permitiría un aumento de la cobertura poblacional por contar con mayor accesibilidad y facilidad de toma, reduciendo costos y empleándose en lugares de escasos recursos. Por lo que aumentaría la aceptación de las mujeres por comodidad, evitando que no se realice la tamización, ya sea por factores culturales o religiosos (103). Para el estudio, no se sabe si la aceptación fue mayor, dado que cada mujer se prestó para los 3 tipos de muestra por lo que se tuvieron que tomar muestras con espéculo, sin embargo, sería algo que debería medirse a futuro por medio de encuestas, actividades de promoción y prevención de la salud las cuales permitan determinar la aceptabilidad de este tipo de muestreo como lo es la orina, sin embargo, basados en la literatura el auto muestreo de por si implica mayor aceptabilidad entre las mujeres.

Es importante identificar las características de las pruebas moleculares en muestras de fluidos corporales como la orina, al comparar 89 muestras cervicales y de orina en un estudio que utilizaba PCR multiplex basada en E7 específico (E7 – MPG) y PCR basada en GP5 + / 6 +, donde se identificaban 21 tipos de VPH comunes en los dos ensayos, se obtuvo una positividad similar en células de cuello uterino de un 57.3% y en orina de 62.9% en el ensayo E7 – MPG, con una identificación más baja en el ensayo basado en GP5+/6+ donde en orina el porcentaje de positividad fue de 30.3% y en muestras de células de cuello uterino de un 40.4% (29).

Frente al estudio que se realizó, la frecuencia de la infección por VPH fue de 41,59 (n= 89), tomando los datos de las tres muestras analizadas, en muestras de tejido cervical fue de 14.35 (n = 31), en muestras de orina fue de 10,65 (n=23), y las muestras de tejido cervical enviadas para su estudio por medio de COBAS 4800 como test de referencia mostraron positividad de 16.59 (n = 35). Donde la positividad entre muestras de tejido cervical y orina fueron similares, lo

que soporta y se correlaciona con estudios anteriores en los cuales la detección de VPH - HR entre estas muestras han sido favorables.

Al comparar la sensibilidad y especificidad en muestras de orina frente a células cervicales por los dos ensayos, se demostró que la identificación de ADN de VPH por medio de E7 – MPG es más elevada con un 80% frente a un 58% determinado por PCR GP5+/6+, mientras que la especificidad fue mayor en PCR GP5+/6+ (89%) frente a un 61% por E7-MPG (29).

Según otros estudios realizados a partir de muestras cervicales y de orina para la identificación de VPH - HR por medio de COBAS 4800, se demostró la detección de VPH – HR en un 14,7% de 787 muestras cervicales y un 11,6% de un total de 578 muestras de orina analizadas. Por otra parte, de este mismo estudio se infiere la sensibilidad y especificidad de COBAS 4800 en la detección de VPH – HR en muestras cervicales y de orina, donde la sensibilidad más alta de VPH – HR se presentó en muestras cervicales con un 97.7% de 5299 muestras estudiadas, y presento una sensibilidad de 63.1% de 5003 muestras de orina analizadas. En cuanto la especificidad se observó un 87.3% en muestras cervicales y un 89.8% en orina (104).

Para la evaluación del rendimiento de la detección de VPH – HR en muestras de tejido cervical y orina por medio de PCR convencional, en muestras de orina se encontró una baja sensibilidad, sin embargo, se ha descrito que las técnicas moleculares poseen una alta sensibilidad, lo que permite el uso de muestras como orina recolectadas fuera del sitio involucrado en la infección para el diagnóstico (100-105,101-106). No obstante, frente a los resultados obtenidos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN estos arrojaron para el tipo VPH 31, VPH 33, VPH 52 y VPH 58 una correlación del 100% en muestras de tejido cervical.

Por lo cual, al evaluar las características operativas de las pruebas (PCR convencional) en muestras de orina, se encontró poca correlación de la sensibilidad frente a muestras de tejido cervical, este hallazgo puede ser explicado debido a que se ha observado limitaciones en las muestras de orina, ya que estas al ser recolectadas lejos del sitio afectado pueden arrojar resultados pobres en términos de sensibilidad (105,106).

En términos de especificidad la orina obtuvo un 83.1 frente a un 83.9 en muestras de tejido cervical, siendo similar la especificidad en muestras de orina y tejido cervical, pero con menor sensibilidad en muestras de orina frente a muestras de tejido cervical. Por otro lado, la especificidad más alta en muestras de tejido cervical fue en VPH 16 y VPH 18 los cuales presentaron una especificidad de 100, y en muestras de orina los VPH 33, VPH 58 y VPH 51 con un 89,5 para estos VPH – HR.

Se ha citado la detección exitosa de VPH en muestras de orina, aunque otros investigadores no han logrado replicar los resultados, en donde estos varían de cero, pobre correlación hasta aproximadamente un 100%, entre la correlación de la de detección de VPH en muestras de tejido cervical (105,106).

Por último, existen pocos estudios que reflejen la utilidad de la detección de ADN de VPH - HR por técnicas moleculares en orina frente al resultado de citología, Sin embargo, la mayoría de estudios han reflejado una frecuencia en la detección de VPH cada vez mayor con la gravedad de la lesión (105,107). Aunque no se encontraron diferencias relevantes entre las muestras de orina y muestras cervicales, para diferentes grados de anormalidades citológicas, se asoció la detección de VPH – HR en muestras de orina y muestras cervicales con una prueba de Papanicolaou con resultado anormal en la misma proporción en las dos muestras pareadas (105,107), En el presente estudio los resultados de citología y la detección de VPH – HR en las

diferentes muestras y prueba COBAS, presentó en orina un 10,7 para VPH – HR con resultado normal de citología y 9,8 con resultado anormal de citología, en muestras de tejido cervical el 17,1 presentaron citología anormal y un 12, 2 mostraron citología normal de VPH – HR positivo, en cuanto la comparación con prueba de COBAS el 22,0 mostro citología anormal con detección de VPH – HR positivo, y el 12,2 obtuvo un resultado normal en citología

El objetivo de la tabla 6, es identificar la distribución de la detección de VPH – HR por fuente y hallazgo citológico, por tanto, el 89,3 (n=117) de muestras orina , el 87,8 (n=115) de muestras de tejido cervical y el 87, 8 (n=117) de muestras remitidas para prueba COBAS fueron negativas en la detección de VPH – HR con un resultado de citología normal, y el 10,7 (n=14), 12,2 (n=16) y 12,2 (n=16) en muestras de orina, tejido cervical y COBAS respectivamente fueron positivas para la detección de VPH – HR con un resultado normal en la citología.

De manera, que al comparar el resultado anormal LEIBG, en donde de las 28 muestras con resultado LEIBG, 21,4 (n=6) son positivas para ADN de VPH – HR en muestras de orina, en muestras de tejido cervical un 17,9 (n=5) obtuvieron un resultado positivo para detección de VPH – HR en muestras de tejido cervical, y por ultimo al comparar COBAS y LEIBG el 35,7 (n=10) fueron positivas para ADN de VPH – HR **Tabla 6**. Por lo que al comparar la detección de VPH – HR frente al grado de la lesión se denota la baja correlación entre el grado de la lesión y la detección de VPH – HR. No obstante, la proporción de la detección en muestras de tejido cervical y de orina frente a resultado de citología fueron similares, lo que apoya algunos estudios donde se presenta la misma relación en la detección de VPH frente a una prueba de citología anormal (105,107).

7.CONCLUSIONES

En la población femenina indígena y no indígena estudiada encontramos diversos factores sociodemográficos que indican un factor de riesgo para la progresión del CCU además de la infección por VPH-HR.

- La mayoría de la población estaba compuesta por mujeres en edad fértil que indicaron iniciar su vida sexual antes de los 18 años (n=143).
- Los genotipos de VPH-HR con mayor frecuencia en las mujeres incluidas en el estudio fueron VPH-45 y VPH-16 en muestras de tejido cervical y VPH -18 (56,5%) y VPH-31 en muestras de orina.
- La determinación de las características operativas de cada muestra en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo tomando como test de referencia COBAS 4800, arrojaron resultados representativos según el tipo de muestra utilizada, por lo que la mayor detección de VPH – HR la cual obtuvo excelente correlación fue en muestras cervicales donde VPH 31, VPH 33, VPH 52 y VPH 58 obtuvieron resultados del 100% en la identificación de estos tipos virales frente al test de referencia COBAS 4800.

- La detección de VPH – HR en muestras emparejadas de tejido cervical y orina fueron similares.
- Las muestras de orina presentaron una buena especificidad en tipos virales tales como VPH-33, VPH-58 y VPH-51.

8.REFERENCIAS

1. GLOBOCAN (IARC). Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012. [Consultado 2018 abril 14]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. GLOBOCAN (IARC). Summary statistics (2012) COLOMBIA. 2012. [Consultado 2018 abril 14]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
3. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol [Internet]. 2002 [Consultado 2018 Jul 14]; 55 (1): 244 - 265. Disponible en: <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/55/4/244.full.pdf>
4. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. Public Health Genomics. 2009;12(5-6):281-290. 2002 [Consultado 2018 Jul 14] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835381/>
5. Instituto Nacional de Salud. INFORME DE EVENTO CÁNCER DE MAMA Y CUELLO UTERINO, COLOMBIA, 2017 [Internet]. [consultado 2018 Jul 27]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/C%C3%81NCER%20DE%20MAMA%20Y%20CUELLO%20UTERINO%202017.pdf>
6. Muñoz M, Camargo M, Soto-De León SC, Sánchez R, Parra D, Pineda A et al. Human Papillomavirus Detection from Human Immunodeficiency Virus-Infected Colombian Women's

- Paired Urine and Cervical Samples [Internet]. 2013 Feb 13. [consultado 2018 Jul 27]; Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article/metrics?id=10.1371/journal.pone.0056509#citedHeader>
7. Denny L. Cytological screening for cervical cancer prevention. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2012 [consultado 2018 Jul 27]; 26: 189–196. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693411001477>
 8. Organización mundial de la Salud [Internet]. WHO. 2018 [Actualizado 2018 febrero 15; consultado 2018 Julio 15]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hvp\)-and-cervical-cancer](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hvp)-and-cervical-cancer)
 9. Saldaña-Téllez M, Montero M, López L. Barreras percibidas por el personal de salud para la toma de la citología cervical en mujeres zapotecas de Juchitán, Oaxaca. *Psicooncología* [Internet]. 2017. [consultado 2018 Jul 27]; 14(2-3): 343-364. Disponible en: <http://revistas.ucm.es/index.php/PSIC/article/viewFile/57090/51526>
 10. Muñoz M, Camargo M, Soto-De León SC, Sánchez R, AC Pineda-Peña, Pérez-Prados A et al. Classical Molecular Tests Using Urine Samples as a Potential Screening Tool for Human Papillomavirus Detection in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women. *J. Clin. Microbiol* [Internet]. 2013 noviembre [citado 2018 junio 15]; 51 (11): 3688-3693. Disponible en: 10.1128/JCM.01302-13
 11. Brinkman JA, Jones WE, Gaffga AM, Sanders JA, Chaturvedi AK, Slavinsky IJ, Clayton JL et al. 2002. Detection of human papillomavirus DNA in urine specimens from human immunodeficiency virus-positive women. *J. Clin. Microbiol* [Internet]. 2002. [consultado 2018 Jul 27]; 40:3155–3161. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/40/9/3155.full>
 12. Camargo M, Soto-De León SC, Sánchez R, Pérez-Prados A, Patarroyo ME, Patarroyo MA. Frequency of human papillomavirus infection, coinfection, and association with different risk factors in Colombia. *Ann. Epidemiol* [Internet]. 2011. [consultado 2018 Jul

- 27]; 21:204–213. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047279710004230>
13. Vorster's A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* [Internet]. 2012. [consultado 2018 Jul 27]; 31:627–640. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-011-1358-z>
 14. Muñoz M, Camargo M, Soto-De León SC, Rojas-Villarraga A, Sánchez R, Jaimes C, Pérez-Prados A et al. The diagnostic performance of classical molecular tests used for detecting human papillomavirus. *J. Virol* [Internet]. 2012. [consultado 2018 Jul 27]; 185:32–38. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093412001863>
 15. Acuña Merchán L, Soler LA, Valderrama F. Boletín de información técnica especializada de la cuenta de alto costo. Boletín técnico CAC. Bogotá D.C. 2018 marzo 26. Disponible en: https://cuentadealtocosto.org/site/images/Publicaciones/2018/Dia_Mundial_de_la_Preencion_del_Cancer_de_Cuello_Uterino.pdf
 16. Herrera, YA, Piña-Sánchez, P. Historia de la evolución de las pruebas de tamizaje en el cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* [Internet]. 2015;53(6):670-677. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457744940002>
 17. Jaim Etcheverry Guillermo. Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2008: Los virus, el cáncer y el sida. *Medicina (B. Aires)* [Internet]. 2009 Feb [citado 2018 Jul 22]; 69(1): 193-196. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802009000100013&lng=es.
 18. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(2):560-563. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC393419/>

19. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983;80(12):3812-3815. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394142/>
20. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO Journal*. 1984;3(5):1151-1157. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC557488/>
21. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-9. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/248/4951/76>
22. Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of Virology*. 1992;66(12):6893-6902. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240306/>
23. Eddy DM. Detección de cáncer de cuello uterino. *Ann Intern Med* [Internet]. 1990 Ago [citado 2018 junio 15]; 113: 214-226. Disponible en: 10.7326/0003-4819-113-3-214
24. Rositch A, Gatuguta A, Choi R, Guthrie B, Mackelprang R, Bosire R Et al. Knowledge and Acceptability of Pap Smears, Self-Sampling and HPV Vaccination among Adult Women in Kenya. *PLOS ONE* [Internet]. 2012 [citado 2018 junio 15]; 7(7). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040766>
25. Sánchez-Seco Higuera P. Cáncer de cérvix uterino. *SEMERGEN* [Internet]. 2002 [Consultado 2018 abril 14]; 28 (3):145-51. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-articulo-cancer-cervix-uterino-S1138359302743931>
26. Gichangi P, Estambale B, Bwayo J, Rogo K, Ojwang S, et al. Conocimiento y práctica sobre el cáncer de cuello uterino y la prueba de Papanicolaou en pacientes del Hospital Nacional Kenyatta,

- Nairobi, Kenia. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2003 [citado 2018 junio 15];13: 827-833. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2003.13612.x>
27. Brown DR, Wilson RM, Boothe MA, Harris CE Cervical cancer screening among ethnically diverse black women: knowledge, attitudes, beliefs, and practices. *Journal of National Medical Association* [Internet]. 2011 [citado 2018 junio 15] 103: 719–728. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0027-9684\(15\)30411-9](https://doi.org/10.1016/S0027-9684(15)30411-9)
28. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence regarding HPV testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* [Internet]. 2012. [consultado 2018 Jul 27]; 30: 88–99. Disponible en: [doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.095](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.095)
29. Ugyen Tshomo, Silvia Franceschi, Tshokey, Tashi Tobgay, Iacopo Baussano, Vanessa Tenet et al. Evaluation of the performance of Human Papillomavirus testing in paired urine and clinician-collected cervical samples among women aged over 30 years in Bhutan. *Virology Journal* [Internet].2017. [consultado 2018 Jul 30]; 14:74. Disponible en: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0744-2>
30. Prado P, YY, Veitía, D, Ferreira, MC, De Guglielmo, Z, Ávila, M, Fernandes, A, Correnti, M. Comparación de la detección y tipificación del virus del papiloma humano en muestras citológicas y de orina en pacientes del sexo femenino. *Investigación Clínica* [Internet]. 2017;58(2):107-118. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=372951141002>
31. Silva R, León D, Brebi P, Ili C, Roa JC, Sánchez R. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev chilena Infectol* 2013; 30 (2): 186-192. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n2/art09.pdf>
32. Daponte A, Tsezou A, Oikonomou P, Hadjichristodoulou C, Maniatis AN, Pournaras S, Messinis IE. Use of real-time PCR to detect human papillomavirus-16 viral loads in vaginal and urine self-sampled specimens. *Clin. Microbiol. Infect* [Internet]. 2008 [citado 2018 junio 15]; 14:619–621. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01974.x>

33. Muñoz CM. Comparación de pruebas para la detección de Virus de Papiloma Humano (VPH) en cérvix y orina de mujeres infectadas con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). [master's thesis]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2013. 87 p. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/58007/1/01186900.2013.pdf>
34. Cómbita AL, Gheit T, Gonzalez P, Puerto D, Hernando Murillo R, Montoya L et al. Comparison between Urine and Cervical Samples for HPV DNA Detection and Typing in Young Women in Colombia. *Cancer Prevention Research [Internet]*. 2016 [Consultado 2018 octubre 23]; 9 (9): 766 - 771. Disponible en: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/canprevres/9/9/766.full.pdf>
35. Vorsters A, Micalessi I, Bilcke J, Ieven M, Bogers J, Van Damme P. Detection of human papillomavirus DNA in urine: a review of the literature. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* [Internet]. 2012 [citado 2018 junio 15]; 31:627–640. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-011-1358-z>
36. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vacuna*. 2012 Nov 20; 30 Suppl 5: F12-23. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12010808?via%3Dihub>
37. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 5): F55-70. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12009735?via%3Dihub>
38. Lowy DR, Schiller JT. Reducing HPV-associated Cancer Globally. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa)*. 2012;5(1):18-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3285475/>
39. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53 Supl 2: S166-71.

40. Concha RM. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2007 Jun [citado 2018 Abr 15]; 24(3): 209-214. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182007000300006
41. Picconi María Alejandra. Human papillomavirus detection in cervical cancer prevention. Medicina (B. Aires) [Internet]. 2013 Dic [citado 2018 Abr 15]; 73(6): 585-596. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802013000800017&lng=es
42. Bravo IG, de Sanjose S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. Trends in Microbiology [Internet]. 2010 [citado 2018 Jul 27]; 18(10): 432–438. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(10\)00135-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X10001356%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(10)00135-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X10001356%3Fshowall%3Dtrue)
43. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Reviews in Medical Virology [Internet]. 2015 [citado 2018 Jul 27];25(Suppl 1):2-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5024016/>
44. Bernard HU, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology [Internet]. 2010 [citado 2018 Jul 27]; 401(1): 70–79. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400342/>
45. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology[Internet]. 2004 [citado 2018 Jul 27; 324:17–27. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268220400220X?via%3Dihub>
46. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. Virology [Internet]. 2013 [citado 2018 Jul 27;445(0):138-168. Dsponible en: [10.1016/j.virol.2013.04.013](https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013)
47. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat. Rev. Cancer [Internet]. 2002 [citado 2018 Jul 27]; 2:342–350. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc798>

48. Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat. Med* [Internet]. 2007 [citado 2018 Jul 27]; 13, 857–861. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nm1598>
49. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet]. 2017 [citado 2018 Jul 27]; 372(1732):20160273. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597740/>
50. Day PM, Schelhaas M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Curr. Opin. Virol* [Internet]. 2014 [citado 2018 Jul 27]; 4, 24–31, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3951680/>
51. McBride AA. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv. Virus Res* [Internet]. 2008 [citado 2018 Jul 27]; 72, 155–205. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151303/>
52. Instituto Nacional de Cancerología. FACTORES DE RIESGO. [Internet]. [citado 2018 Jul 27]
53. Sanabria Negrín JG, Fernández Montequín ZC, Cruz Hernández IC, Pérez LO, Llanuch Lara M. El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Rev Ciencias Médicas* [Internet]. 2011 Dic; 15(4): 295-319. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942011000400026&lng=es.
54. Frontela Noda M, Rodríguez Marín Y, Ríos Hernández MA, Hernández Menéndez M. Infección por *Chlamydia trachomatis* como cofactor en la etiología del cáncer cervical: a cofactor in the etiology of cervical cancer. *Rev cubana Obstet Ginecol* [Internet]. 2014 Mar; 40(1): 68-78. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2014000100008&lng=es.
55. Sarduy Nápoles Miguel R. Neoplasia Intraepitelial Cervical: Preámbulo del cáncer cérvicouterino. *Rev cubana Obstet Ginecol* [Internet]. 2008 Ago. [citado 2018 Jul 27] ; 34(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2008000200004&lng=es.

56. Beltrán Lissabet, JF. Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [Internet]. 2014;45(2):108-118. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181231236005>
57. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature [Internet]. 1985 [citado 2018 Jul 27]; 314:111–114. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983228>
58. Klingelhutz AJ, Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. Virology [Internet]. 2012 [citado 2018 Jul 27]; 424(2):77-98. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703738/>
59. Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. Oncogene [Internet]. 1989 [citado 2018 Jul 27]; 4:1529–1532. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556677>
60. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. J Virol [Internet]. 1991 [citado 2018 Jul 27]; 65:473–478. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240541/>
61. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia [Internet]. 2007 [citado 2018 Jul 27]; pp. 2299–2354.
62. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell [Internet]. 1990 [citado 2018 Jul 27]; 63:1129–1136. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(90\)90409-8.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867490904098%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(90)90409-8.pdf?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867490904098%3Fshowall%3Dtrue)

63. Elbel M, Carl S, Spaderna S, Iftner T. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* [Internet]. 1997 [citado 2018 Jul 27]; 239:132–149. Disponible en : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682297988607?via%3Dihub>
64. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* [Internet]. 1990 [citado 2018 Jul 27]; 9:153–160. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC551641/>
65. Mansur C P, Androphy E J. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1993 [citado 2018 Jul 27]; 1155:323–345. Disponible en. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304419X93900133?via%3Dihub>
66. Giarrè M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leão MJ, Tommasino M. Induction of pRb Degradation by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Is Essential to Efficiently Overcome p16 Imposed G₁ Cell Cycle Arrest. *Journal of Virology* [Internet]. 2001 [citado 2018 Jul 27]; 75(10):4705-4712. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114225/>
67. Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* [Internet]. 1993 [citado 2018 Jul 27]; 67:2521–2528. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237571/>
68. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 15 de diciembre de 2010; 127 (12): 2893-917. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>
69. Sorbye SW, Arbyn M, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. HPV E6/E7 mRNA testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical

- biopsy. PLoS One. 2011; 6 (10): e26022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998748>
70. Papanicolaou, G. N. 1949. A survey of actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. Ann. Intern. Med. 31:661-674. Disponible en: <http://annals.org/aim/article-abstract/674177/survey-actualities-potentialities-exfoliative-cytology-cancer-diagnosis>
71. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16 (1):1-17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145302/>
72. Benoy IH, Vanden Broeck D, Ruymbeke MJ, Sahebali S, Arbyn M, Bogers JJ, et al. Prior knowledge of HPV status improves detection of CIN2+ by cytology screening. Am J Obstet Gynecol. 2011;205(6):569. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903190>
73. Katki HA, KW, Fetterman B, Lorey T, Poitras NE, Cheung L, Demuth F, Schiffman M, Wacholder S, Castillo PE. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. the lancet oncology. 2011;12(7):663-72. Disponible en: <http://europepmc.org/articles/PMC3272857>
74. Sanabria Negrín José Guillermo, Fernández Montequín Zoila C, Cruz Hernández Inalvis de la Caridad, Pérez Leonardo Oriolo, Llanuch Lara Margarita. El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2011 Dic [citado 2018 Oct 27]; 15(4): 295-319. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942011000400026&lng=es.
75. Cortiñas Paula, Ríos Katuska, Sánchez Lander Jorge. Citología cervical como pesquisa: Factores para mejorar la sensibilidad. Gac Méd Caracas. [Internet]. 2008 Mar [citado 2018 Oct 27]; 116(1): 37-40. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622008000100006&lng=es.

76. Varela S. Revisión bibliográfica: Citología cervical. Rev Med Hondur. 2005; 73:131-136. Disponible en: <http://65.182.2.244/RMH/pdf/2005/pdf/Vol73-3-2005-7.pdf>
77. Chacón J, Sanz I, Rubio MD, de la Morena ML, Díaz E, Mateos ML et al. Detection and genotyping of high-risk human papillomavirus in cervical specimens. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2007. [consultado 2018 Jul 30]; 25:311-6. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-genotipado-del-virus-del-13102266>
78. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. Revista Archivo Médico de Camagüey. [Internet]. 1999. [consultado 2018 Jul 30]; 3:2. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011
79. Schwarz E, Freese U. K., Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Streamlau A Et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature [Internet]. 1985. [consultado 2018 Jul 30]; 314: 111-114. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983228>
80. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. Journal of General Virology [Internet]. 1991. [consultado 2018 Jul 30]; 72: 1039-104. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/72/5/JV0720051039.pdf?expires=1533786814&id=id&acname=guest&checksum=05B21D8E9BBA7A3700BA68DEBB6EF4A0>
81. Bobadilla ML, Zorrilla ME, Villagra V, Olmedo G, Roscher GI, Franco FI. Detección molecular del virus papiloma humano de alto riesgo oncogénico en muestras cervicales. Laboratorio Central de Salud Pública. Primeros Resultados. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. Vol. 13(1) 2015: 13 (1): 117-23. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v13n1/v13n1a04.pdf>
82. Gutierrez Rojo R. Utilidad de las técnicas moleculares de detección de VPH en el control y prevención del cáncer cervicouterino. Medigraphic [Internet].2011. [consultado 2018 Jul 30]; 5: 16 - 23. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/archivostgi/tgi-2011/tgi115c.pdf>

83. Iftner T Y Villa L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Natl Cancer Inst Monogr [Internet]. 2003. [consultado 2018 Jul 30]; 31:80-88. Disponible en: <https://academic.oup.com/jncimono/article/2003/31/80/951066>
84. Martínez-Portilla RJ, López-Velázquez JL, Martínez-Rojas GC, AguilarVillagómez MI, De la Torre-Rendón FE, Villafán-Bernal JR. Prevalence of HPV high-risk serotypes detected by PCR in patients with normal cervical cytology at the Hospital Regional Adolfo López Mateos, ISSSTE. Ginecol Obstet Mex. 2016 September;84(9):556-561.
85. Amador Pérez. C., López Velázquez JL, Herrera Cintora J, Tamariz Herrera E, De la Torre Rendón FE, Barriga Araujo F, Mendoza Larios LD. Genotipificación del Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR) mediante PCR en pacientes de 25 a 34 años de edad con resultado de citología anormal. Arch Med Actual Trac Gen Inf 2013; 5 (9). Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/archivostgi/tgi-2013/tgi139f.pdf>
86. Lindemann, Maria & Chacón de Antonio, Jesús & Rodriguez-Dominguez, Mario & Sanz, Itziar & Dolores Rubio, María. (2011). 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. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica - Enferm Infec Microbiol Clin. 29. 411-414. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X11000279>
87. Roche. Roche lanza su prueba COBAS HPV para los sistemas para el cribado del cáncer de cuello uterino en los mercados que aceptan la certificación CE. Comunicado de prensa. Basilea. 2017. Disponible en: <https://www.roche.com/dam/jcr:97096b38-e43e-4a4d-a015-c3549d05716e/en/med-cor-2017-03-28-sp.pdf>
88. Roche. La FDA autoriza la prueba de VPH de Roche para identifica a las mujeres con mayor riesgo de cáncer de cuello de útero. Comunicado de prensa. Basilea. 2011. Disponible en: <https://www.roche.com/dam/jcr:1bc2b4de-95cc-402e-8351-2a49906a5ed3/de/med-cor-2011-04-20-sp.pdf>

89. Sijvarger CC, González JV, Prieto A, Messmer AG, Mallimaci MC, Alonio VL et al. Epidemiología de la infección cervical por virus Papiloma humano en Ushuaia, Argentina. *Rev. argent. Microbiol* [internet].2006; 38 (1): 19-24. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v38n1/v38n1a05.pdf>
90. Qu W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C. J., Ho, G. Y., Klein, R. S., & Burk, R. D. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1304–1310. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229739/>
91. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 1991 May;72 (Pt 5):1039-44. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/72/5/JV0720051039.pdf?expires=1532726267&id=id&accname=guest&checksum=605C0365750721C39AE21FEDD2BD2E7D>
92. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Rys J, Kopec J, Daszkiewicz E. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochimica Polonica* [internet]. 2006 october 1 [Consultado 2018 enero 20]; 53(3): 603 –607. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.443.8120&rep=rep1&type=pdf>
93. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology* [internet]. 1991 [Consultado 2018 enero 22]; 72: 1039 –1044. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/72/5/JV0720051039.pdf?expires=1518293876&id=id&accname=guest&checksum=5BFC9B6B89EF447A15EFB9F63A7CC5F7>
94. Caracol Radio [Internet]. Más de 1.800 mujeres mueren al año en Colombia por cáncer de cuello uterino. 2018. Consultado 2018 agosto 12. Disponible en: http://caracol.com.co/radio/2018/03/23/nacional/1521817144_801773.html

95. OPS. Posibilidad de detectar virus del papiloma humano mediante prueba urinaria. Instantáneas. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 14(5), 2003. Disponible en: <https://scielosp.org/pdf/rpsp/2003.v14n5/357-357/es>
96. Luisa DR-O, Sara S-DL, Milena C, Ricardo S, Manuel Elkin P, Manuen Alfonso P. The Prevalence of High-Risk HPV Types and Factors Determining Infection in Female Colombian Adolescents. PLoS One. 2016;11(11): e0166502.
97. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. The Journal of infectious diseases. 2010;202(12):1789-99.
98. Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Herrero R, Meijer CJ, et al. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. British journal of cancer. 2009;100(7):1191-7.
99. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. The male role in cervical cancer. Salud pública de Mexico. 2003;45 Suppl 3: S345-53.
100. Hager WD. Human papilloma virus infection and prevention in the adolescent population. Journal of pediatric and adolescent gynecology. 2009;22(4):197-204.
101. de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2003;103(6):705-8.
102. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. Sex Transm Dis. 1996;23(4):333-41.
103. Bernal S. Detección y genotipado simultáneo del virus del papiloma humano: utilidad de la muestra de orina. [Tesis doctoral]. España: Universidad de Sevilla; 2014. 143 p. Disponible en: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/57442/2014bernadetec.pdf?sequence=1>
104. Stanczuk G, Baxter G, Currie H, Lawrence J, Cuschieri K, Wilson A Et al. Clinical validation of hrHPV testing on vaginal and urine self-samples in primary cervical screening (cross-sectional

- results from the Papillomavirus Dumfries and Galloway—PaVDaG study). *BMJ Open* [Internet]. 2016. [consultado 2018 Jul 27]; 6. Disponible en: <https://bmjopen.bmj.com/content/6/4/e010660>
105. Sehgal A, Gupta S, Parashari A, Sodhani P, Singh V. Urine HPV-DNA detection for cervical cancer screening: Prospects and prejudices. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* [internet]. 2009 [Consultado 2018 Agosto 18]; 29:7, 583-589. Disponible en: <https://scihub.tw/10.1080/01443610903061736>
106. Cratchfelt KA, Welsch LE, DeBonville D, Rosenstraus M, Quinn TC. Detection of Neisserie gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis in genitourinary specimens from men and women by a co-amplification PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* [internet]. 1997 [Consultado 2018 Agosto 18]; 35:1536–1540. Disponible: <https://scihub.tw/https://jcm.asm.org/content/35/6/1536.long>
107. Brinkman JA, Jones WE, Gaffga AM, Sanders JA, Chaturvedi AK, Slavinsky J III et al. Detection of Human papilloma virus DNA in urine specimens from Human immunodeficiency viruspositive women. *Journal of Clinical Microbiology* [internet]. 2002 [Consultado 2018 agosto 18]; 40:3155–3161. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130806/>