

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA



Tesis

“Tipificación Molecular de VPH en Pacientes del Estado de Michoacán”

Para obtener el título de Licenciado

En Quimicofarmacobiología

Presenta,

Andrés vera rosas

Asesor:

MC. Irvin Eduardo Jacome Galarza

ENERO 2011

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología



TESIS

“Tipificación Molecular de VPH en Pacientes del Estado de Michoacán”

Para obtener el título de Licenciado

En Quimicofarmacobiología

Presenta,

Andrés Vera Rosas

JURADO DEL EXAMEN PROFESIONAL

QFB. Sandra María Suárez Moreno

D.C. Rafael Ortiz Alvarado

QFB. Ricardo Vega Tavera

Morelia, Michoacán 2011

Universidad michoacana de San Nicolás de hidalgo



Facultad de Químico Farmacobiología

Tesis presentada por Andrés Vera Rosas

Como requisito parcial para obtener el título de Licenciada en Quimicofarmacobiología.

Presidente del Jurado

Vocal del Jurado y Director de Tesis

Secretario del Jurado

Jefe del Departamento



1 ÍNDICE

1	ÍNDICE	1
2	INDICE DE TABLAS	2
3	INDICE DE FIGURAS	3
4	ABREVIACIONES	4
5	RESUMEN	5
6	INTRODUCCIÓN	6
7	JUSTIFICACIÓN	19
8	HIPÓTESIS	20
9	OBJETIVOS	21
9.1	OBJETIVO GENERAL	21
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
10	ESQUEMA DE TRABAJO	22
11	MATERIALES Y MÉTODOS	23
12	RESULTADOS	41
13	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
14	PERSPECTIVAS	44
15	CONCLUSIONES	45
16	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	46



2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tipos del virus del papiloma Humano
y su relación con el tipo de lesión pag 12

Tabla 2 Reactivos para la prepare el
workig buffer AL pag 32

Tabla 3 Siclos del termosiclador para PCR pag 35

Tabla 4 Reactivos y proporciones para preparar
los buffer de trabajo el de lavado
y el buffer de citratos. pag 37



3 INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i>	Esquema del mapa genómico del VPH	pag 7
<i>Figura 2</i>	Estructura de la proteína E7 del virus del papiloma humano	pag 8
<i>Figura 3</i>	Interacción de E7 con pRb	pag 9
<i>Figura 4</i>	Estructura de la proteína E6 del virus del papiloma humano	pag 11
<i>Figura 5</i>	Blancos celulares de la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano involucrado en la transformación celular.	pag 11
<i>Figura 6</i>	Mecanismo de daño célula por virus del Papiloma humano	pag 13
<i>Figura 7</i>	Descripción de los ciclos de la PCR.	pag 17
<i>Figura 8</i>	Toma de muestra para la detección del virus del papiloma humano por Hc2 captura de híbridos.	pag 23
<i>Figura 9</i>	Porcentaje de muestras positivas	pag 42
<i>Figura 10</i>	Porcentaje de muestras positivas	pag 42



4 ABREVIACIONES

DNA	Acido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
VPH	Virus del papiloma humano
Hc2	método de captura de híbridos
CaCu	cáncer cervico uterino
E6-AP	proteína asociada E 6



5 Resumen

En el presente proyecto se realizó la identificación de Virus del Papiloma Humano en muestras provenientes de exudado de cérvix, para 483 mujeres del estado de Michoacán en edades entre los 20 y 65 años, las cuales fueron tomadas en el Hospital de la Mujer de Morelia, Michoacán, utilizando la técnica de Captura de Híbridos (Digene Corporation) como tamizaje, posteriormente se realizó la selección de las muestras positivas las cuales se tipificaron utilizando la técnica de Arreglos Lineales (Roche), la cual permite identificar hasta 37 tipos de virus del Papiloma Humano de Alto y Bajo Riesgo. Se encontró que el 34% de las muestras presentan coinfecciones virales (más de 2 tipos de Virus del Papiloma Humano).



6 INTRODUCCIÓN

El Virus de Papiloma Humano pertenece a una de las familias de virus mas estudiada debido a sus repercusiones sobre la humanidad, pose uno de los genomas más grandes. Tiene una gran preferencia por los las células epiteliales de la piel y membranas mucosas de tal manera que posee una gran importancia dentro de la salud humana debido a su correlación con el cáncer cervicouterino (1,4,11).

Alguna de las características importantes del género papilomaviridae son (3):

- Virus pequeños y sin envuelta. Las partículas virales tienen un diámetro de 52 a 55 nm y un coeficiente de sedimentación de 300 S.
- El Virón es icosaedrico de 55 nm de diámetro
- Se encuentra compuesto de DNA en un 10% y proteína en un 90%.
- El genoma se encuentra compuesto de DNA (Acido desoxirribonucleico) de doble cadena circular de aproximadamente 8,000 pb
- Contiene dos proteínas estructurales, L1 y L2, asi como 8 genes que codifican para proteínas tempranas.
- Características sobresalientes:
 - Estimula la síntesis de DNA celular
 - Variedad restringida de huéspedes y tropismo tisular
 - Causa importante de cáncer humano un particular cervicouterino

La cápside viral es icosaédrica y está organizada en 72 capsómeros. Cada uno de estos capsómeros está constituido por dos proteínas estructurales, ambas codificadas por el virus, que se unen y estabilizan la cápside mediante puentes bisulfuro (la proteína mayor L1, que tiene un peso molecular de 55 Kd y representa el 80% del total de la cápside, cada capsómero presenta 5 copias idénticas y; la proteína menor L2, que está en menor proporción que L1 y tiene un peso molecular de aproximadamente de 75 Kd) (3,8).



Su expresión se encuentra regulada por factores celulares como son tejidos, así como por las propias proteínas virales. Mientras que los genes de expresión tardía, se expresan en las células diferenciadas del epitelio a partir de un promotor tardío (PL) para sintetizar las proteínas estructurales de la cápside viral: L1 y L2. Los papilomavirus son muy específicos de las especies que infectan son afines a células del tejido epitelial estratificado queratinizado.(2,8,7)

Los genes de expresión temprana son expresados en las células no diferenciadas de la epidermis. A partir de un promotor temprano (PE) se generan las proteínas virales tempranas: E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8 que son proteínas no estructurales, relacionadas con el control de la replicación, la transcripción y la expresión genética del virus, como se muestra en la figura 1(7,8)

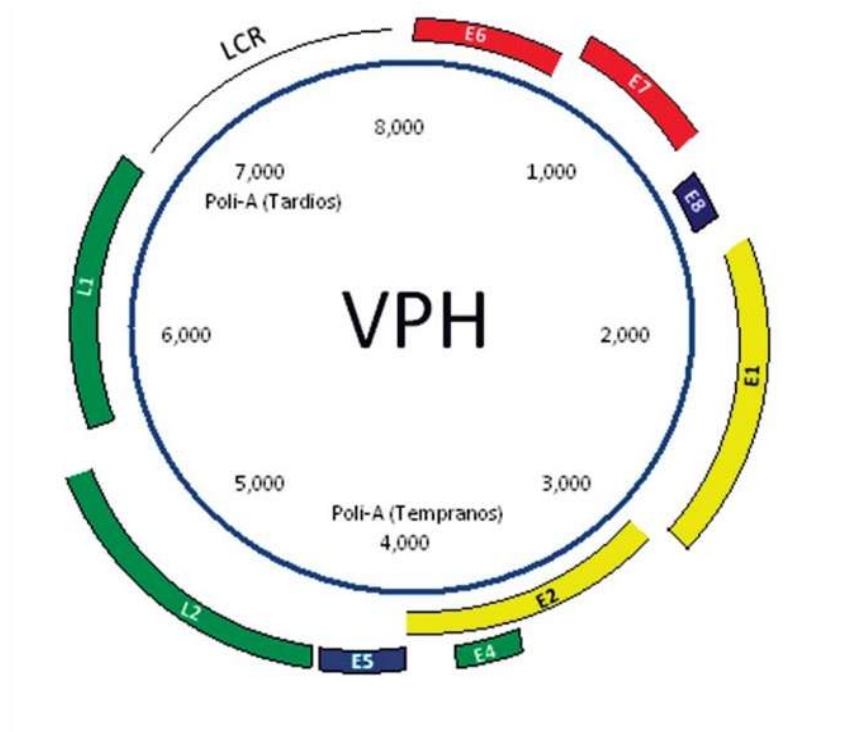


Figura 1. Esquema del mapa genómico del VPH



Dos de las proteínas más importantes son la E6 y E7 su estructura y función son descritas a continuación.

- El gen E7 codifica para una proteína nuclear de 98 aminoácidos, la cual presenta tres dominios, como se esquematiza en la figura 2:
 1. CR1 que se encuentra en el extremo amino terminal.
 2. CR2 la cual contiene el motivo LXCXE, este es el sitio donde se ancla la proteína RB.
 3. CR3 gracias a esta se forman dímeros, por un motivo de zinc.

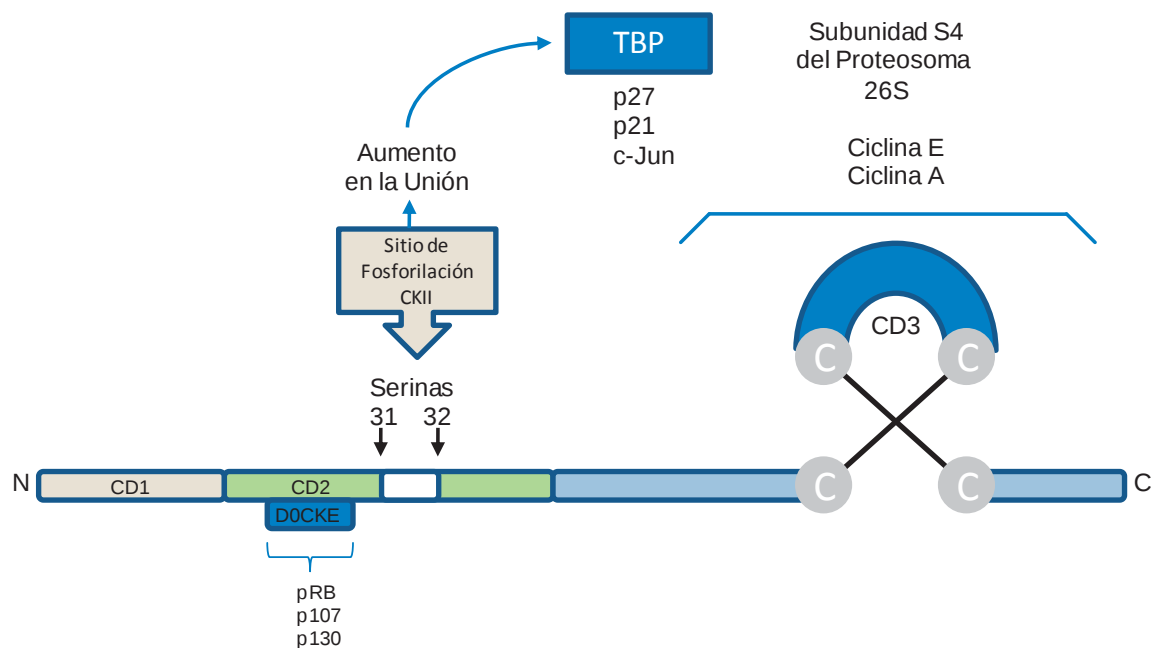


Figura 2. Estructura de la proteína E7 del virus del papiloma humano

La proteína E7 interactúa con diferentes proteínas que regulan el ciclo celular, especialmente aquellas que interactúan en el cambio de G1 a S, en este grupo de proteínas se encuentran las de la familia de las supresoras de tumor de retinoblastoma (Rb), p107, p130, deacetilasas de histonas (HDAC), factores de transcripción AP-1 proteínas de unión a la caja TATA (TBP), cíclicas, cinasas dependientes de cíclicas (cdks). La interacción de estas proteínas y E1 hace que la célula pierda el control a la hora de la división celular logrando así una elevada producción de células malignas, consiguiendo la immortalización y finalmente la transformación. (3,7,8)



En células que están en condiciones normales Rb no se encuentra fosforilado y se encuentra formando complejos con factores de transcripción de la familia E2F, estos complejos inhiben la transcripción de genes que se encuentran involucrados en la progresión hacia la fase S, sin embargo, cuando la célula progresa hacia la fase G0, Rb es fosforilado por cinasas dependientes de ciclinas liberando a si el factor de transcripción E2F, el cual activa genes involucrados en la síntesis de DNA para así permitir la progresión del ciclo celular. (3,7,8)

Cuando la proteína E7 se encuentra presente en la célula secuestra el Rb evitando la formación de complejos E2F, induciendo así a entrar al estadio S de una forma muy prematura, mientras que Rb por otro lado es degradado por la ruta del proteosoma, con esto se llega a la conclusión que el E7 con la transcripción de diferentes grupos de genes, es capaz de descontrolar el proceso de diferenciación y progresión del ciclo celular como se ejemplifica en la Figura 3.

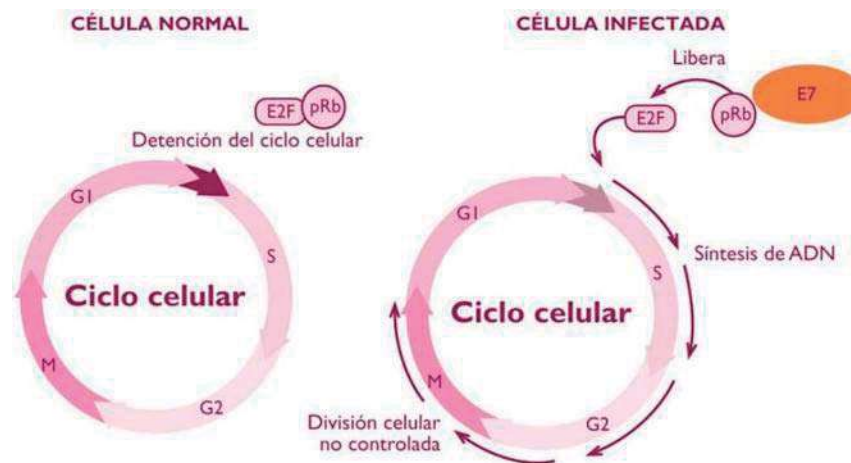


Figura 3. Interacción de E7 con pRb

La proteína E6 con dos dominios de dedos de zinc esta proteína se encuentra distribuida en el citoplasma y en el núcleo. Se ha llegado a la conclusión de que esta proteína es la



causante de la immortalización de las células y en conjunto con la proteína E7 causa la transformación celular.

Esta proteína tiene la capacidad de bloquear la apoptosis y alterar la maquinaria de transcripción celular, inhibe interacción célula-célula e incrementa el tiempo de vida de la célula, provocando así la proliferación excesiva de células epiteliales, disminución de su diferenciación, conduciendo así a la formación de células malignas y benignas.

La proteína E6 tiene como blanco a p53 y a otras proteínas como: E6-AP la proteína de unión E6-BP otras como paxilina Bak, GPS2 y la proteína cinasa N (PNK). Además E6 altera el índice de transcripción de genes como los que codifican la subunidad catalítica de la telomerasa humana y del factor de crecimiento de endotelio bascular (VEGF). Figura 4

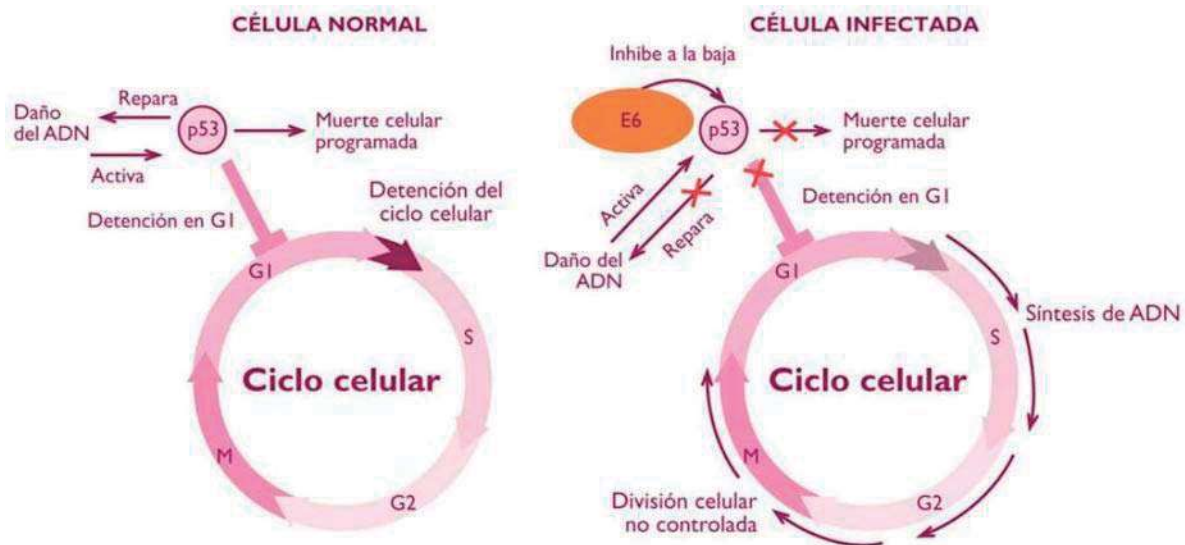


Figura 4. Interacción de la proteína E6 con p53

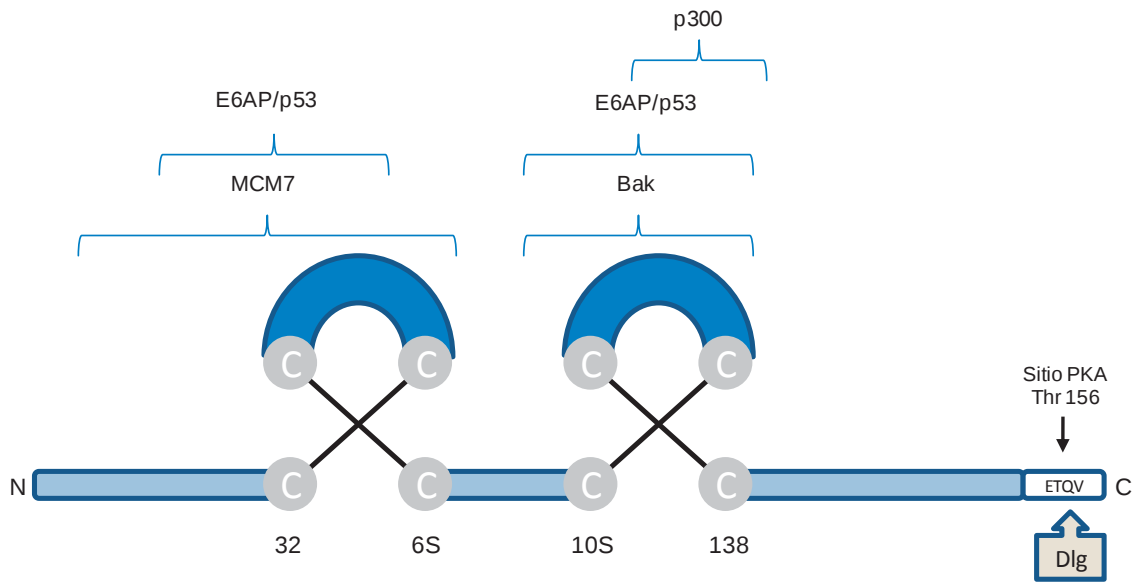


Figura 5. Estructura de la proteína E6 del virus del papiloma humano

La inactivación de p53 se debe a que E6 forma un complejo con la ubiquitina ligasa E6AP, la formación de este complejo da como resultado la ubiquitinación de p53 y su subsiguiente degradación en la ruta del proteosoma. (3,7,8)

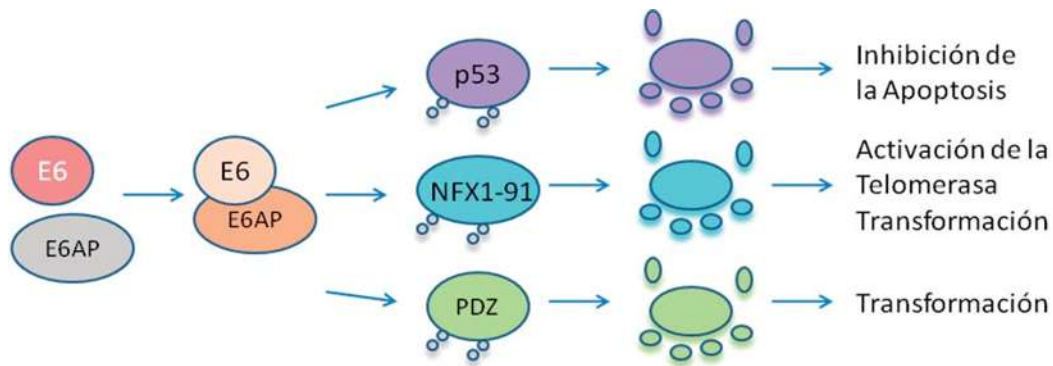


Figura 6. Blancos celulares de la oncoproteína E6 de los virus del papiloma humano involucrados en la transformación celular.



La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) considera que los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 son carcinógenos para los humanos –tipos de alto riesgo oncológico- y que otros tipos, incluidos el VPH 6 y el VPH 11, son posibles carcinógenos para los humanos – tipos de bajo riesgo oncológico (1, 4, 5,11)

Tipo de VPH	Oncogenicidad	Relación con el tipo de lesión
6, 11, 42, 43, 44	Baja	Bajo Riesgo (Condilomas, Precancerosas)
16 y 18	Alta	Alto Riesgo (Precancerosas, Invasoras)
31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Intermedia	Alto Riesgo (Lesiones de transito rápido)

Tabla 1. Tipos del virus del papiloma humano y su relación con el tipo de lesión

La infección por papilomavirus ocurre a través de lesiones en el epitelio, que exponen las células de la capa basal a la entrada de las partículas virales. Una vez en el interior, el ciclo del virus está unido al programa de diferenciación de las células y aprovechando la maquinaria celular se replica y se propaga.

Durante la actividad sexual existe un microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de HPV, permitiendo la unión entre el receptor de la célula basal con la proteína de la cápside viral L1, a nivel de su extremo carboxi-terminal. Dicho receptor ha sido asociado estructuralmente con Heparán Sulfato para los tipos virales 16 – 33 y con Alfa-6-Integrina para VPH 6. Una vez unido el virus a la superficie celular, se produce su internalización al citoplasma de la célula huésped, proceso que ha sido identificado como endocitosis.(2, 3, 7,)



Dos sistemas han sido reconocidos; el primero involucra un complejo proteico llamado Clatrina, utilizado por los tipos 16 y 18; el segundo, utiliza un grupo de proteínas principalmente Caveolina, denominado endocitosis por caveolas, en el que participa el VPH 31. (2, 3, 7, 12)

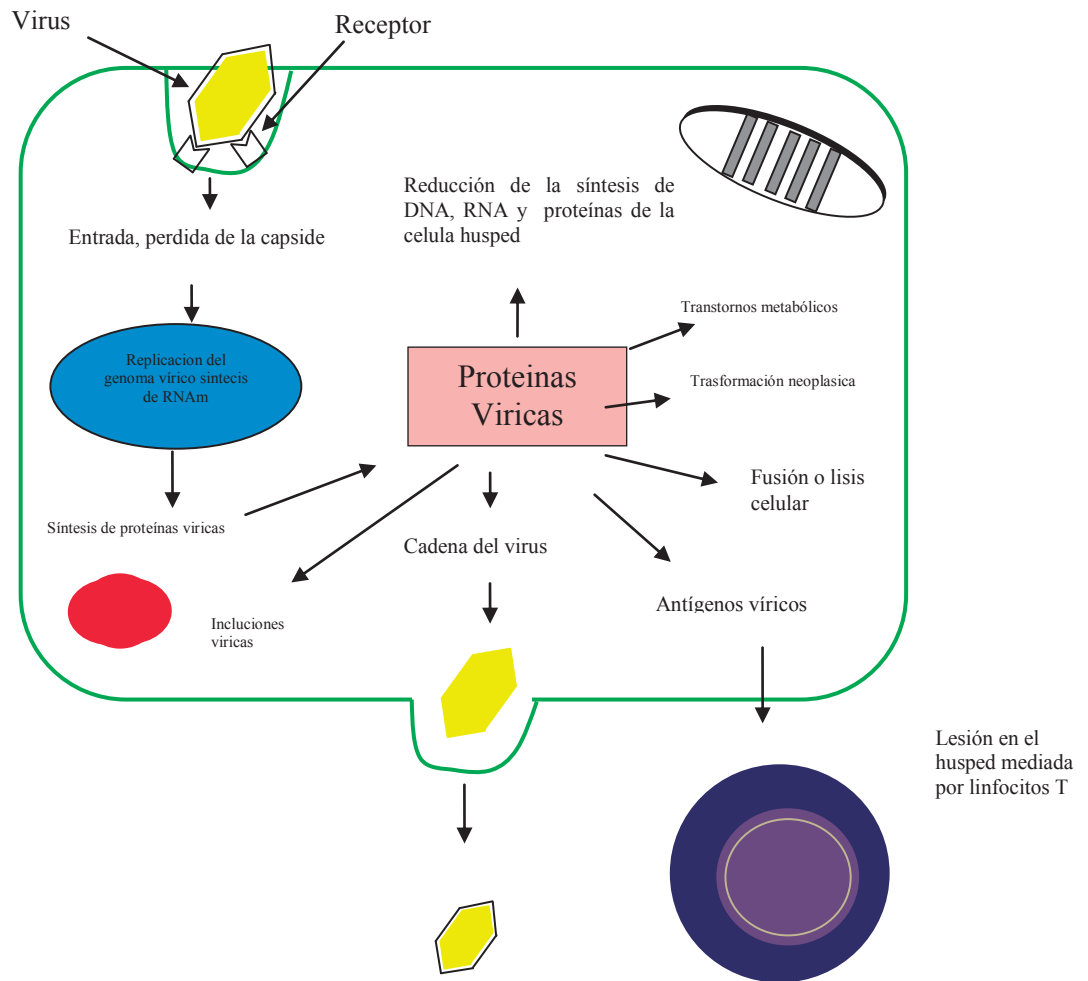


Figura 7. Mecanismo de daño célula por virus del papiloma



Posterior a la endocitosis, existe evidencia en modelos de infección por partículas virales tipo 11 y 16 que la cápside viral de 55 nm de diámetro experimenta degradación en el citoplasma celular, a través de un proceso de reducción química que daña los puentes disulfuro que estabilizan la cápside, originando capsómeros y monómeros, los cuales son transportados al núcleo junto a pequeños fragmentos del ADN viral, pudiendo atravesar los poros nucleares de un diámetro aproximado a 39 nm, con ello el genoma viral y las proteínas de la cápside participarían en los procesos de transcripción génica, replicación del ADN y maduración de viriones.⁽¹²⁾

En este proceso de replicación del ADN viral participan un grupo de proteínas, cuyas características principales se mencionan a continuación:

E1 corresponde a una proteína multimérica con actividad ATPasa y helicasa, capaz de reconocer sitios específicos en el ADN viral, llamadas regiones de origen de replicación (ori), formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas (principalmente E), quinasas dependiente de ciclinas y ADN polimerasa α , en la región p68, participando además proteínas de la célula huésped. ⁽⁷⁾

E2 corresponde a una proteína dimérica que forma un complejo proteico con E1 antes mencionado. En este proceso, E2 es fosforilado por quinasas en los residuos aminoacídicos de serina 298 y 301, regulando su unión con E1. ⁽⁷⁾

Por otra parte, E2 reprime al promotor P97 (VPH 16) o P105 (VPH 18), ubicado próximo al gen TATA box, encargado de la transcripción de las proteínas E6 y E7, reduciendo de esta manera la síntesis de estas proteínas. También se ha demostrado que E2 activa directamente la síntesis de la proteína P53 lo que produciría finalmente la detención del ciclo celular en G1 y apoptosis. ⁽⁷⁾

En México el CaCu es la primera causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años. El Sistema Nacional de Salud Mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de CaCu invasor y se registran 4,000 muertes anualmente.



En el año 2005, se reportaron 4,051 muertes en mujeres por CaCu, con una tasa de mortalidad de 8.8 por cada 100,000 mujeres. Para el año 2006 se registraron 4,323 casos con una tasa de 8.6 por 100,000 mujeres. Sin embargo, este tipo de cáncer es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil, cuando el diagnóstico es oportuno. La experiencia de países desarrollados ha permitido demostrar que la mejor opción para disminuir la mortalidad por CaCu es la detección y el tratamiento oportuno de lesiones precursoras y lesiones malignas por medio de programas de detección oportuna del CaCu. (1,4,11)

Uno de los métodos más utilizados para la detección de CaCu es la técnica de tinción Papanicolaou que es la técnica más antigua para su detección y prevención a sido de gran utilidad por sus bajos costos y por la facilidad de llegar a las paciente. El Papanicolaou consiste en un raspado de células de cuello uterino y colocado en una laminilla de vidrio la cual se colorea con un tinción especial después es leída por un medico profesional patólogo o un técnico citotecnista el cual analiza las características de las células que le permite señalar anomalías en estas producidas por una neoplasia. Esta técnica tiene una serie de desventajas desde la preparación de las laminillas pasando por la tinción y finalizando con la lectura lo que llevo a esta técnica a perder confiabilidad en el diagnostico de CaCu.(5)

La colposcopia es el estudio del cérvix a través de un microscopio, para observar detalles del epitelio y vasos sanguíneos. Antes de iniciar el estudio, es necesaria la aplicación de ácido acético al 3 ó 5% para ayudar a discriminar el epitelio normal del anormal. (6,9)

En los epitelios dañados hay un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, lo que permite que el ácido penetre y cause aglutinación de proteínas, fenómeno responsable del color blanco que toma el epitelio enfermo. La colposcopia es considerada una técnica más sensible, menos específica y de mayor costo que la citología para la detección de enfermedad cervical preinvasiva e invasiva. Su utilización puede reducir significativamente los porcentajes de falsos negativos de la citología.



En las dos últimas décadas, el desarrollo de la biología molecular ha sido explosivo, implementándose técnicas de gran utilidad para la investigación y el diagnóstico clínico. En el caso específico de los VPH, solamente existe una prueba cualitativa aprobada por la Food and Drug Administration por sus siglas en inglés (FDA) para uso clínico: la captura de híbridos. El fundamento de esta prueba es la formación de híbridos de ARN-ADN, que se cuantifican por medio de quimioluminiscencia. Se toman células del endo y ecto cérvix con un cepillo y se depositan en un medio de transporte especial que conserva la muestra a temperatura ambiente, al mismo tiempo que lisa las células.(6,8,12)

El formato hc2 HPV DNA Test puede incluir dos mezclas de sondas, una para la detección de 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) la detección de 5 tipos de bajo riesgo (6,11, 42, 43, 44). El ensayo puede realizarse con la sonda de bajo riesgo y/o de alto riesgo. Por otro lado, el formato hc2 High Risk DNA Test incluye sólo la mezcla de sondas para la detección de los 13 tipos de VPH de alto riesgo.

El VPH es uno de los virus de cultivar invitro y una parte de los pacientes infectados por este virus no presentan un título de anticuerpos demostrables por lo que las pruebas de ácidos nucleídos (DNA) utilizando las técnicas de PCR son la mejor opción ya que este método tiene un alto nivel de sensibilidad. (8)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis en los años ochentas, esta prueba ha revolucionado la genética molecular permitiendo así el estudio de una amplia gama de genes, ya que esta técnica nos permite producir un enorme número de copias de una secuencia de DNA específica (amplificada). El fundamento de la técnica es el siguiente(8, 12, 13):

Desnaturalización; la primera reacción es calentar a altas temperaturas el material (DNA) para así poder reducir la doble hélice de este material a cadenas simples RNA estas cadenas se tornaran accesibles a los cebadores.



Hibridación; se enfría la mezcla de reacción. Los cavadores hibridan con las regiones complementarias de las cadenas de DNA patrón y se forman nuevamente cadenas dobles entre los cebadores y las secuencias complementarias.

Extensión; La Taq polimerasa sintetiza una cadena complementaria. La enzima lee la secuencia de la cadena opuesta y extiende los cebadores agregando nucleótidos en el orden que pueden emparejarse este proceso se repite una y otra vez multiplicando así nuestro DNA.

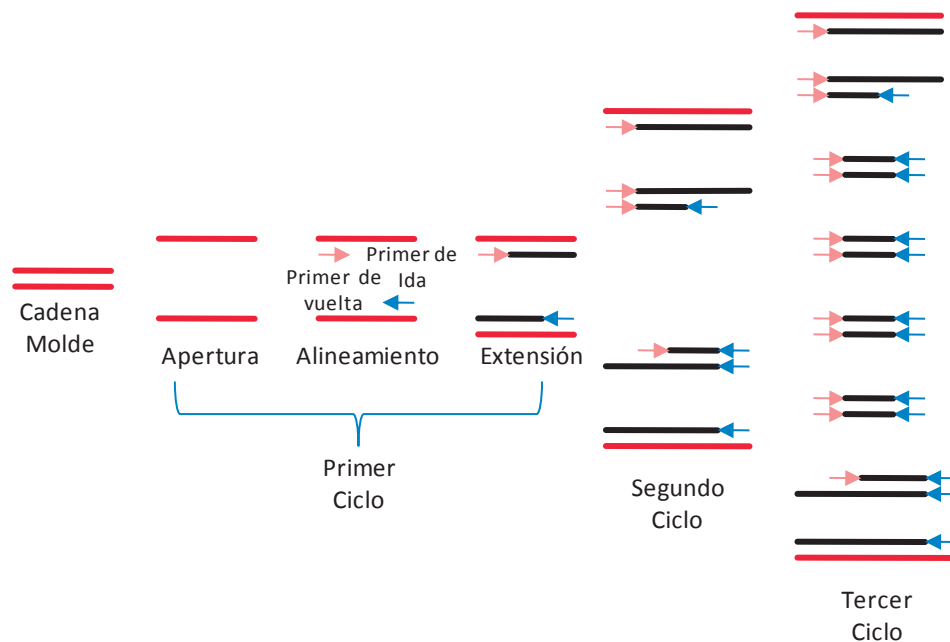


Figura 8. Descripción de los ciclos de la PCR.

La determinación de la carga viral se ha convertido en una necesidad debido a que los diferentes estudios realizados indican que un alto número de copias de ADN viral, o al menos de VPH del tipo 16, está relacionado con el incremento en el riesgo del desarrollo de una lesión cervical asociada a VPH.



Los sistemas de PCR se diferencian según el diseño del sistema de amplificación, en función de que detecten tipos específicos, o bien aquellos capaces de identificar un amplio número de tipos, denominados de amplio espectro. Las PCR específicas de tipo, utilizan cebadores que han sido diseñados para detectar un tipo determinado de VPH, por consiguiente, la detección de diferentes tipos implica la realización de múltiples reacciones de PCR. La determinación de la carga viral se ha convertido en una necesidad debido a que los diferentes estudios realizados indican que un alto número de copias de ADN viral, o al menos de VPH del tipo 16, está relacionado con el incremento en el riesgo del desarrollo de una lesión cervical asociada a VPH^(14,15)



7 JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer de cérvix ocupa la segundo lugar a nivel mundial, es necesario la identificación y tipificación molecular del Virus del Papiloma Humano lo cual nos permitirá identificar oportunamente el virus así como lesiones causadas esto con el fin de fortalecer el programa de detección oportuna de VPH en el estado.



8 HIPÓTESIS

Los virus de Papiloma de Alto Riesgo causan una lesión mayor en la paciente debido a que se presentan en co-infectados en más de un genotipo en la misma paciente, lo cual acelera el proceso infeccioso.



9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GENERAL

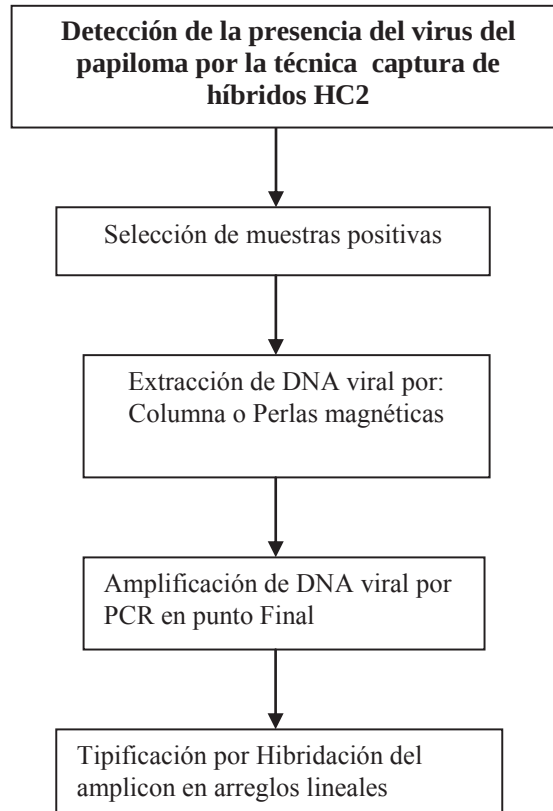
Tipificación molecular de hasta 37 tipos de virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el porcentaje de VPH presente en el hospital de la mujer de Morelia Michoacán por medio de la técnica de HC2
2. Tipificar las muestras positivas por medio de la técnica de HC2
3. Conocer el VPH más frecuente en la población analizada



10ESQUEMA DE TRABAJO





11 MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra para captura de híbridos

- Limpiar perfectamente el exceso de mucosidad del orificio externo del cuello uterino, y los alrededores del exocervix.
- Introducir el cepillo hasta que las cerdas toquen el exocervix, se hace girar tres veces por completo con sentido contrario a las manecillas del reloj (esto para traer el mayor número de células de tejido escamoso posible). No introducir por completo el cepillo en el canal cervical
- Retirar el cepillo. Evite que las cerdas toquen las paredes, la parte exterior del tubo o cualquier otro objeto.
- Introducir la punta del cepillo el fondo del tubo de transporte. Cortar el excedente del mango del cepillo en la marca del borde del tubo.(dejando la punta del cepillo dentro del tubo sumergida en el buffer)
- Ajustar la tapa del tubo hasta que se encuentre bien cerrado.(no es necesario agitarlo)

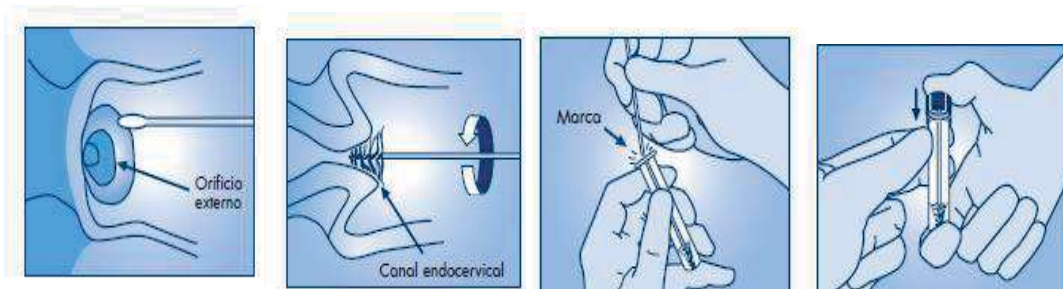


Figura 9. Toma de muestra para la detección del virus del papiloma humano por Hc2 captura de híbridos.



Proceso de muestras a la llegada al laboratorio

Las muestras llegan a recepción donde:

- Se corrobora el numero de muestras enviadas
- La fecha de toma
- Le fecha de envió
- Temperatura a la cuan llega
- Código de barras
- Formato de muestra
- Se verifica que estén en orden en las gradillas
- Se trasladan al área de biología molecular
- Las muestras se almacenan y se conservan de la siguiente forma:
 - I. 1 semana a temperatura ambiente
 - II. 2 semanas en refrigeración (4-8 °C)
 - III. 3 meses a -20°C



Identificación de Virus del Papiloma Humano por la técnica de Captura de híbridos.

1. Desnaturalización

Método de Vortex Manual

Crear un diseño de placa

Etiquetar microtubos de hibridación.

Preparar reactivo de desnaturalización



Pipetear 500 ul de reactivo de desnaturalización

(El volumen es equivalente a la mitad del volumen de la muestra)

en calibradores, controles de calidad y muestras.

Dar vortex a cada muestra y control de calidad individualmente por 5 segundos a alta velocidad e invertir.



Revisar que todos los tubos muestren un color morado



Incubar a $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 45 ± 5 minutos



Preparar sonda de mezcla de VPH



2. Hibridación

Realizar la incubación en Incubador de micro placa

Mezclar bien la muestra desnaturalizada y pipetear 75µl calibrador desnaturalizado, control de calidad o muestra en microtubos de hibridación.



Incubar por 10 minutos a 20-25°C



Pipetear 25µl de sonda de mezcla de VPH de alto riesgo en microtubos



Cubrir microtubos con una placa selladora y agitar en Rotary Shaker I
(Agitador Rotatorio I) a 1100 ± 100 rpm por 3 ± 2 minutos

Revisar que todos los tubos muestren un color amarillo debido a un cambio de pH
(las muestras con solución PreservCyt se tornarán rosas)



Incubar a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ por 60 ± 5 minutos



Preparar microplaca de captura.



3. Captura de Híbridos

Transferir el contenido de cada placa de hibridación o microtubo correspondiente en microplaca de captura usando una pipeta de 8 canales



Cubrir con una placa de tapa o una placa selladora

Agitar a 1100 ± 100 rpm a $20-25^{\circ}\text{C}$ por 60 ± 5 minutos. Preparar buffer de lavado.



Decantar y secar la microplaca de captura

4. DETECCIÓN DE HÍBRIDOS

Pipetear 75 μl de reactivo de detección 1 en cada microplaca de captura.

Cubrir microplaca de captura con una placa de tapa o parafilm o su equivalente.

Incubar a $20-25^{\circ}\text{C}$ por 30-45 minutos. Lavar la microplaca .



5. LAVADO

Método manual de lavado

Decantar y secar microplaca de captura



Lavar 6 veces



Secar en toallas de papel libres de fosfatasa Alcalina (Kimswipes)

6. Ampliación de la Señal

Pipetear 75 µl de reactivo de detección 2 en cada microplaca de captura

Cubrir con una placa de tapa o placa selladora. Incubar a 20-25°C por 15-30 minutos.



7. LECTURA

Leer microplaca de captura en luminómetro



Validar el Análisis e interpretar resultados de las muestras.

Selección de muestras positivas y posterior tipificación utilizando el método de Linear Array Hpv Genotyping Test

1. Pre-PCR: preparación de reactivos

- Asegurarse que los reactivos suficientes para la preparación de la muestra y amplificación se encuentra a temperatura ambiente.
- Asegurarse que todas las muestras y controles se encuentran a temperatura ambiente
- Registrar el numero de lote de los reactivos en el tray map
- Determinar el número de micro AM necesarios para completar la corrida de trabajo. Colocar los tubos en la gradilla y base para muestra, asegúrelas bien con el retenedor.
- Preparar el HPV master mix de trabajo adicionando 125µl de Mg mezclado perfectamente a un vial de HPVMMX mezclar por inversión de 10-15 veces. No mezclar en vortex el Master Mix de trabajo. La mezcla de trabajo es suficiente para 12 reacciones de amplificación.
- Pipetear 50µl del Master Mix de trabajo en cada tubo utilizando puntas con filtro. No cerrar los tubos microAmp
- Colocar la gradilla de muestra MicroAmp y el numero apropiado de tapas en una bolsa plástica desechable resellable



- Colocar la gradilla de muestra MicriAmp al área de preparación de muestras conservada a 2-8 °C hasta su uso.

2. Pre-PCR: preparación de la muestra

- Asegúrese que los reactivos suficientes para la preparación de la muestra y de amplificación/detección se encuentren a temperatura ambiente.
- Asegúrese que todas las muestras y controles se encuentran a temperatura ambiente.
- Precalentar el termoblock a 56°C
- Precalentar el termoblock a 70°C
- La extracción no debe realizarse en una mesa de trabajo. Limpie la campana de flujo laminar o de bioseguridad y la micropipetas con una solución de 0.5% de hipoclorito de sodio recién preparado seguida de una solución de etanol al 70%.
- Identifique el número de tubos de 2.0mL con tapa de rosca estériles con el número correspondiente a las muestras y controles. No utilizar tubos de 1.5mL con tapa de presión.
- Registrar los números y posiciones de las muestras y controles en el “tray map”. Revisar la apariencia de las soluciones ATL o AL disolverlo calentando a 70°C y con agitación constante.
- Adicionar 80µl de buffer ATL a cada tubo.
- Mezclar en vortex cada una de las muestras y controles por 10 segundos y pipetear 250µl del correspondiente muestra o control en los tubos apropiados. Utilice una punta nueva en cada caso y procese un tubo a la vez.
- Incubar los tubos en un termoblock precalentado a 56°C por 30 minutos (armar el QIAvac24(plus) vacum manifold durante el periodo de incubación siguiendo las instrucciones del fabricante)



1. Colocar la tapaQLAvac 24 lid sobre la base QIAvac24base , asegurándose que el gasket ajuste perfectamente en la ranura de la QIAvac24
 2. Insertar un vaccontenedor en cada vacvalvula (cerrar todas las posiciones sin usar)
 3. Conectar la QIAvac 24 a una bomba de vacío.
 4. Retirar del blíster el número requerido de columnas QIAamp. Guarde el tubo de colección de desechos para más adelante
 5. Marque el numero requerido de columnas QIAamp MinElute con la información de la muestra o control.
 6. Coloque las columnas QIAamp MinElute marcadas con los VacConnectors del manifold.
- Reconstituir el carrier RNA (tapa de color roja) adicionando 310µL de elución buffer AVE (tapa de color purpura)
 1. Tape nuevamente y mezcle en el vortex por 10 segundos.
 2. Marque el vial de carrier RNA. El carrier RNA sin usar es estable a 2-8°C por 24 horas o puede ser alicuotado y congelado a -20°C.
 - Agregar 30 mL de etanol al buffer AW2
 1. Usar solo etanol absoluto ($\geq 96\%$)
 - Prepare el working buffer AL adicionando el volumen apropiado de carrier RNA al buffer AL de acuerdo a la siguiente tabla.
 1. Agregar el buffer AL a un tubo cónico de polipropileno estéril.
 2. Adicionar el carrier RNA reconstituido al buffer AL. Si el carrier RNA fue previamente congelado, lleva a temperatura ambiente y mezcle bien por inversión antes de usar.
 3. Tape los tubos y mezcle por inversión de 10-15 veces



4. NO MEZCLAR EN VORTEX – el mezclar en vortex produce espuma en la solución Working buffer AL estable de 2-8°C hasta por 48 horas

	NUMERO DE MUESTRAS /CONTROLES A PROCESAR						
Reactivos	12	24	36	48	60	72	96
RNA carrier (mL)	0.04	0.07	0.10	0.13	0.16	0.20	0.25
Buffer AL (mL)	4.0	7.0	10.0	13.0	16.0	20.0	25.0

Tabla 2 Reactivos para la prepare el workig buffer AL

- Después de finalizar la incubación de las muestras y controles a 56°C PIPETERAS 250µl de Working buffer AL en cada tubo y mezclar en vortex por 10 segundos a máxima velocidad
 1. Utilice una punta nueva en cada caso y procese un tubo a la vez

- Incubar los tubos en un termoblock precalentado a 70°C por 15 minutos
 1. Mezcle los tubos en el vortex ocasionalmente durante el periodo de incubación

- Pipetear 300µL de alcohol absoluto a cada tubo y mezclar en vortex por 15 segundos a máxima velocidad. Abrir un tubo a la vez
 1. Utilice una punta nueva para procesar un tubo a la vez.



- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Realizar un spin 3-5 segundos a todos los tubos a máxima RCF.
 1. Insertar una extensión de columna en cada columna QIAmp.

- Transferir el lisado del tubo a la correspondiente columna QIAmp
 1. Permitir la incubación por lo menos un minuto a TA antes de aplicar el vacío
 2. Encender la bomba de vacío para remover todo el lisado y aplicar el vacío al manifold por al menos 1 minuto más.
 3. Apagar la bomba de vacío y liberar el resto del vacío.

- Agregar 750µL de buffer AW2 a cada columna.
 1. Permitir la incubación por al menos un minuto antes de aplicar el vacío.
 2. Encender la bomba de vacío para remover todo el lisado y aplicar el vacío al manifold por al menos 1 minuto más.
 3. Apagar la bomba de vacío y liberar el resto del vacío.

- Agregar 750µL de etanol absoluto a cada columna
 1. Utilizar únicamente alcohol absoluto ($\geq 96\%$)
 2. Permitir la incubación por lo menos un minuto antes de aplicar el vacío
 3. Encender la bomba de vacío para remover todo el lisado y aplicar el vacío.
 4. Apagar la bomba de vacío y liberar el resto del vacío



- Cuidadosamente retire la extensión de la columna cierre la tapa de la columna QIAamp y descarte el tubo de extensión.
 1. Descarte cada tubo de extensión individual de la misma forma
 2. No pase la extensión de columna sobre las columnas ya que puede causar contaminación.
- Trasfiera las columnas QIAamp en los tubos de colección de desecho de 2.0mL provenientes del paso numero 8 centrifugar a máxima RFC por 3 minutos.
- Marque el numero requerido de tubos de elución 1.5mL
- Descarte los tubos de colección de desecho y coloque las columnas QIAamp en el tubo de elución correspondiente a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Adicionar 120µl de buffer AVE a las columnas QIAamp y cerrar las tapas.
- Incubar las columnas a temperatura ambiente por 5 minutos y después centrifugar a máxima RFC 1 minuto.
- Retirar las columnas QIA de los tubos de elución.
 1. Descartar las columnas QIAamp
 2. Cerrar cuidadosamente cada tubo de elución conteniendo los ácidos nucleicos listos para la PCR.
 3. Las muestras y controles procesados pueden ser conservadas a temperatura ambiente hasta por 6 horas
 4. Más de un proceso de congelación –descongelación puede resultar en una pérdida de señal-
 - 5.
- Desechar el vacconertor (limpiar el manifold de la bomba de vacío, las vacvalves y las tuberías: enjuagar con agua , incubar 20 min en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% seguida de solución de etanol 70%



- Pipetear 50µL de muestra eluida/control en un tubo de amplificación correspondiente.
 1. Asegúrese visualmente que los volúmenes correctos Han sido agregados a los tubos de amplificación
 2. Tapar los tubos de amplificación después de que todas las muestras han sido agradas.
 3. La solución Working master mix con la adición de las muestras/controles es estable por 45 minutos a temperatura ambiente.
- Limpiar la Gabinete de Bioseguridad

3. PCR: amplificación

- Colocar la gradilla micro amp tray en el termosiclador TC9700
- Colocar el programa del termosiclador de acurdo a la siguiente tabla.
 1. Asignar method name y user name
 2. Seleccionar el método asignado y presionar START
 3. Asegurarse de que la velocidad (Ramp START) esta colocada a mx y que el volumen de reacción sea de 100µl en la pantalla de method options.

Programa	Descripción	Numero de Ciclos
Hold	50°C, 2 minutes	1
Hold	95°C ,9minutes	1
Cycle	95°, 30 seconds 55°C, 1 minute 72°C, 1 minute	40
Hold	72°C, 5 minutes	1
Hold	4°C, indefinitely	1

Tabla 3. Ciclos del termosiclador para PCR



- presionar nuevamente START.
 1. anote el tiempo estimado de finalización de la amplificación
 2. retire la gradilla dentro de las 4 horas posteriores al inicio del programa final hold-
- adicione inmediatamente 100µl de DNA (desnaturalizante) a cada uno de los tubos repitiendo 5 veces un movimiento ascendente y descendente del pipeteador para mezclar el contenido de los tubos
- el amplicon desnaturalizado puede conservarse a temperatura ambiente hasta por 5 horas antes de proceder a la detección. De no ser posible la detección vuelva a tapar los tubos con tapas nuevas y almacenar a 2°C a 8°C durante 7 días.

4. Post-PCR:

- Precalentar el baño con agitación a 53°C
- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente, calentar el concentrado de SSPE , el concentrado de SDS en el baño de agua a 53°C para disolver el precipitado.
- Retirar la gradilla del termomezclador dentro de las primeras 4 horas del inicio del hold final.
- Cuidadosamente retire las tapas de los tubos e inmediatamente pipetear 100µl de solución de desnaturalización a cada uno de los tubos de amplificación utilizando puntas con filtro mezclar aspirando y resuspendiendo 5 veces
- Iniciar la detección dentro de las siguientes 5 horas o mantener hasta por 7 días en refrigeración de 2-8°C
- preparar el Buffer de hibridación de trabajo , Buffer de lavado ambiental y Buffer de Citratos de acuerdo a la siguiente tabla:



Volumen suficiente para 100 tiras			
Reactivos	Buffer de hibridación De trabajo (4x SSPE, 0.5% SDS)	Buffer de lavado de trabajo (1xSSPE ,0.1% SDS)	Buffer de citratos de Trabajo
D H2O	388ML	2520ML	475mL
20X SSPE	100ML	133ML	-
20%SDS	12.5ML	13.3ML	-
20X Buffer de Citratos	-	-	25mL

Tabla 4 Reactivos y proporciones para preparar los buffer de trabajo el de lavado y el buffer de citratos.

- Estables por 30 días a temperatura ambiente
- Precalentar el Buffer de hibridación a 53°C por al menos 15 min previo a su uso.
- Preparar el Buffer de lavado Astringente como sigue:
 1. Adicionar 5mL de Buffer de lavado de trabajo por tira y calentarlo a 53°C por al menos 15 minutos previo a usarse.
- Sacar de la bolsa resellable el número de tiras LINER ARRAY HPV requeridas utilizando pinzas limpias. Identifique las tiras con un marcador resistente al agua marcador/químicos.
- Coloque las tiras individualmente en la gradilla especial para las técnicas con las sondas adheridas, una en cada pozo de la gradilla.
- Pipetear 4mL del Buffer de hibridación precalentado en cada pocillo de tira correspondiente.



- Pipetear 75 μ l de amplicon desnaturalizado al pocillo de la tira correspondiente.
 1. Mezclar meciendo la gradilla adelante y atrás entre cada pipeteo de muestra
- Cubra la gradilla e incube en el baño maría a 53°C por minutos a velocidad de agitación orbital de aproximadamente 60 RPM colocar una pesa de 0.5 kg encima de la gradilla para prevenir que la gradilla se deslize.
 1. El nivel del agua no devera cubrir más de 0.5 cm de la profundidad exterior de la gradilla para prevenir salpicaduras
 2. No permita que las muestra salpiquen de un pocillo a otro
 3. No permita que el agua del baño maría salpique dentro de los pocillos
 4. No apilar la gradilla en el baño maría
- Preparar el conjugado de trabajo mezclando 5.0 mL de wash buffer ambiental y 15 μ l de SA-HRP para cada tira (strip) mezclar bien. El conjugado de trabajo es estable por 3 horas a temperatura ambiente.
- Remover la bandeja del baño de agua. remover el buffer de trabajo de hibridación por vacio de aspiración secar la tapa de la bandeja con papel absorbente.
- Anadir 4 mL del Buffer de lavado ambiental a cada uno, mover gentilmente la bandeja 3-4 veces hasta que se aclare las tiras, inmediatamente aspirar por espacio el Buffer de lavado.
- Añadir 4 mL of Buffer de lavado astringente de trabajo (pre-calentado) a cada tira. Limpiar la tapa de la bandeja con un papes absorbente, colocar la tapa en la bandeja e incubar a 53°C $\pm$ 2°C con movimiento (aproximadamente 60 RPM) en el baño de agua por 15 minutos (paso de lavado astringente).



- Remover la bandeja del baño de agua aspirar el liquido de cada una.
- Añadir 4 mL de Buffer de lavado ambiental, mover gentilmente 3 - 4 veces hasta aclarar las tiras. Aspirar inmediatamente el líquido por vacío.
- Añadir 4mL de Buffer de lavado ambiental a cada tira e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente en una plataforma con movimiento (aproximadamente 60 RPM) aspirar el liquido por vacío.
- Repetir el paso de lavado descrito en el paso 15
- Añadir 4 mL Buffer de citratos a cada una de las tiras e incubar aproximadamente a 60 RMP por 5 minutos a temperatura ambiente en una plataforma con movimiento
- Preparar el sustrato como se indica a continuación
 1. Añadir 4 mL SUB A a 1 mL de SUB B por tira que a sido procesada mezcle bien 8 el sustrato debe ser almacenado a temperatura ambiente, proteger de la exposición directa de la luz . es estable por tres horas.
- Aspirar el citrato de cada una de las tiras por vacío.
- Añada 4 mL de agua destilada o desionizada por tira. Las tiras pueden ser almacenadas por un día a temperatura ambiente en H₂O asta interpretación.
- Retirar una a una las tiras de la bandeja y colocarlas en una superficie limpia y seca y dejar al aire por una hora antes de la interpretación
- Retira una a una las tiras de la bandeja y colocarlas en una superficie limpia y secar al aire por una hora antes de interpretar.(las tiras pueden permanecer secándose hasta por 72 horas antes de la interpretación.
- Interpretar las tiras manualmente, utilizando la guía de referencias de hpv .alineando la línea de referencia a la guía con las líneas marcadas en la tira. Leer individualmente las distintas marcas por el tamaño en la tira. Leer individualmente las distintas marcas por el tamaño en la tira.

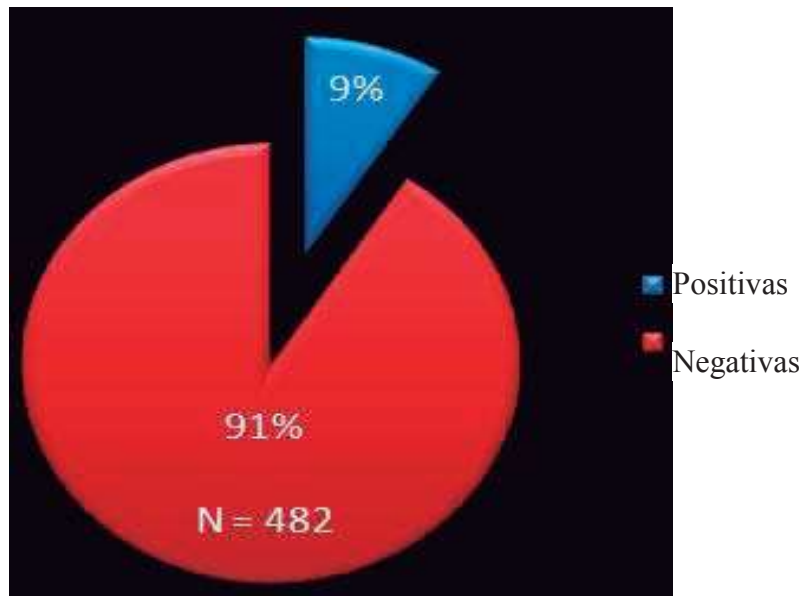


1. Guardar las tiras mojadas hasta la interpretación
 2. Los resultados son interpretados leyendo el patrón de líneas azules en la tira de HPV para determinar cuál de los genotipos de HPV se presenta en las muestras de DNA
- limpiar la bandeja de la siguiente manera: remojando toda la noche con 10% de solución RBS35. posteriormente para aclarar utilice agua destilada secar antes de usar.
 - las partes como el vac conector vacvakver y el qia vac 24 plus vacuum manifold se lavan con etanol y posteriormente con agua destilada



12 RESULTADOS

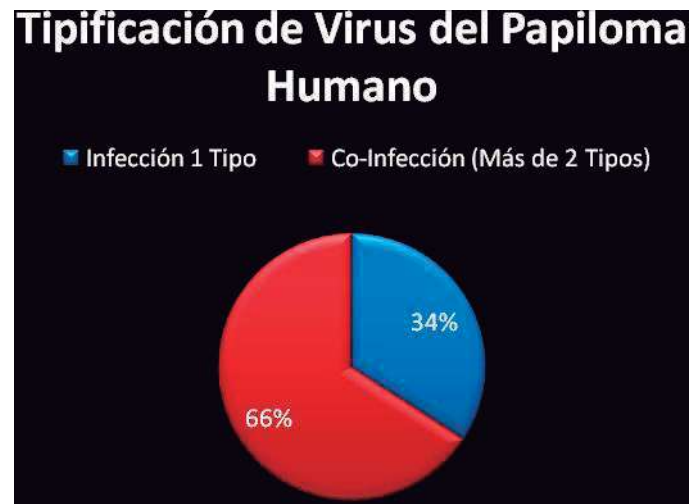
- Se tomaron 483 muestras de cérvix de pacientes entre los 20 y 64 años de edad, las cuales fueron procesadas por medio de la técnica de captura de híbridos, de las cuales 44 muestras fueron positivas





Edad	N = 482		Positivas N = 44	
	N	%	N	%
19-28	13	2.7	5	11.36
29-38	99	20.5	15	34.09
39-48	179	37.1	15	34.09
49-58	125	25.9	5	11.36

- Se tipificaron un total de 43 muestras tipificadas, el 345 de las muestras son coinfecciones con una prevalencia del VPH tipo 59.



- Los virus que se encuentran relacionados con las co-infecciones son 31, 35, 39, 45, 51, 53, 56, 59, 58, 52, 33, 16, 71, 62, 46, 66, 69, 81, 54, 55, 73, 61, 6, 67, 11.
- Los virus que mas están relacionados en las coinfecciones son 58, 52, 33 y 35.



13 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este proyecto se busco la tipificación del virus del papiloma humano utilizando una técnica de biología molecular, logrando así la obtención de resultados muy interesantes el primero es que se muestran una serie de coinfecciones entre distintos serotipos del virus del papiloma humano, dándonos una expectativa de nuevos avance al tratamiento de esta enfermedad ya que con estos resultados podemos dar un tratamiento específico. El segundo beneficio es que nos ayuda en la obtención de estadística epidemiológica acerca de las enfermedades que produce este virus con pacientes de nuestra región ya que la estadifica y la mayoría de trabajos que ay acerca de este virus solo están dedicados a la población americana o europeas si se busca trabajos sobre la población mexicana ay muy pocos o no es suficiente la referencia mas cercana que tenemos son sobre estadística latino americana y por4 nuestra condición de mestizaje y no tener una pureza en nuestra raza no hace muy diferentes hasta en la incidencia de los serotipos de virus que atacan a la población mexicana. Así que este trabajo nos da una mirada asía la incidencia específica de serotipos que afectan ala población de mujeres michoacanas; las estadísticas publicadas por la OMS indican que los serotipos de mayor frecuencia son el 16 y 18 pero como a sido mencionado anteriormente es en población muy distinta a la mexicana este estudio en si nos revela que la incidencia de este virus es el serotipo 59 y que este en lo particular se encuentra relacionado con otros serotipos en coinfecciones no solo con virus de alto riesgo sino que con virus de bajo y mediano riesgo lo9 que nos indica que la relación entre estos favorece el desarrollo de la infección. Aun que nuestro estudio no pueda determinar que se acelere el desarrollo la infección si se puede determinar que que los procesos en coinfecciones son mas avanzados. Lo que se plantea al ave una coinfeccion es el primer virus de lato riesgo y que es el responsable de atacar la primera capa de cérvix lo daña y hace al tejido continuo vulnerable al ataque de otros virus como son los de bajo y mediano riesgo.el tercer beneficio es que nos da una vistazo a la utilización de la vacuna que se a implementado en nuestro país está diseñada para proteger a las mujeres de los serotipos 16 y 18 ya que estos fueron considerados los serotipos de mayor incidencia con poblaciones europeas estadounidenses y en una proporción latinoamericana. Pero los resultados que se arrojaron con este trabajo colocan a los serotipos 16 y 18 en uno de los serotipos de menor incidencia en pacientes del estado de Michoacán dejando a la vacuna con un espectro de protección bajo ante los demás serotipos ya que no ofrece una protección cruzada.



14PERSPECTIVAS

Se busca que este trabajo sea continuado y reforzado con otros estudios dependientes de estos resultados como lo son monitorear a las pacientes para seguir su clínica y aplicar tratamientos específicos contra los serotipos específicos que se obtuvieron demostrando así que un tratamiento específico ayudaría a remediar los efectos de esta clase de virus.

Comprobar que la relación entre virus de alto riesgo, bajo y mediano riesgo conllevan a un proceso que acelere la evolución del daño que producen estos virus.

Que esos resultados beneficien al diseño de una vacuna mas específica para el serotipo que tiene mayor incidencia en pacientes del estado de Michoacán haciendo a si la prevención mas oportuna de esta mal.



15CONCLUSIONES

- Se logro la tipificación de 44 muestras positivas al virus del papiloma humano
- Se obtuvo la incidencia del serotipo 59 en pacientes del estado de Michoacán
- Se confirmo la relación entre serotipos de alto bajo y mediano riesgo en pacientes



16REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Isabel Pachón del Amo, Alejandro Arteaga Rodríguez, Maria Victoria Martínez Aragón, Isabel Peña-Rey, Beatriz Pérez Gómez, Julia del Amo Valero, Marina Pollán Santamaría “Virus del papiloma humano situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización” Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones de las Comunidades Autónomas, el 20 de febrero de 2007.
2. René Rivera Z, Jorge Delgado D, Vicente Painel P, Raúl Barrero P, Angélica Larraín H.a. mecanismos de infección y transformación neoclásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. Matrona, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Obstetricia, Universidad de Santiago de Chile. 2006
3. Vinay kumar, MBBS, MD, FRCPath, ABUL K. ABBAS, MBBS, NELSON FAUSTO, MD. ” Patologia estructural y funcional”. Editorial Elsevier. 7º edición. Publicado 2006.
4. Ana C. Hidalgo-Martínez. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México. 2007.
5. Varela Lema L, Queiro Verdes T. Detección de los oncogenes E6/E7 para el diagnóstico precoz de cáncer de cuello de útero. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidade, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t; 2010. Serie Avaliación de Tecnoloxías. Consultas técnicas; CT2010/01.
6. Karla R. Dzul-Rosado, Marylin Puerto-Solís, María del R. González-Losa. Cáncer cervico uterino: métodos actuales para su detección. Laboratorio de Virología. Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 2006
7. Elizabeth Ball. Virus del papiloma humano biología molecular genética y mecanismo oncogénico parte 11 derm venez 2005
8. Adela Carrillo, M en C,⁽¹⁾ Alejandro Mohar, MC, Dr en C,⁽¹⁾ Abelardo Meneses, MC, ⁽¹⁾ Mauricio Frías-Mendivil, M en C,⁽¹⁾ Gilberto Solorza, MC,⁽¹⁾ Marcela Lizano, Dra en C. ⁽¹⁾ Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Salud Publica Mex 2004;46:7-15



9. M Paz Cañadas, Lic,⁽¹⁾ Belén Lloveras, Inmunol,⁽²⁾ Attila Lorincz, PhD,⁽³⁾ Maijo Ejarque, Dr,⁽¹⁾ Rebeca Font, Lic,⁽²⁾ F. Xavier Bosch, Epidemiol,⁽²⁾ Silvia de Sanjosé, PhD.⁽²⁾ Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. Salud Publica Mex 2006;48 :373-378.

10. Roche. Información técnica LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test México 2010

11. Marcela Lizano-Soberón¹, Adela Carrillo-García¹ y Adriana Contreras Paredes. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Lizano et al, Cancerología 4 (2009): 205-216

12. Maritza Muñoz¹, José A. Mendoza¹, Luis Téllez¹, María E. Noguera², Orlando Moret³, Mercedes López⁴, Morelva Toro⁴. **Detección de VPH-16 y 18 en muestras de cérvix de mujeres que acuden a centros asistenciales de la ciudad de Mérida, Venezuela.** ¹Departamento de Microbiología y Parasitología Clínicas, ²Departamento de Ginecología y Obstetricia. Facultad de Medicina. ³Centro Clínico “Dr. Marcial Ríos”. ⁴Cátedra de Citología, Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela **Rev Biomed 2003; 14:61-68.**

13. Clopper Road. Manual hc2 HPV DNA Test An in vitro Nucleic Acid Hybridization Assay with Signal Amplification using Microplate Chemiluminescence for the Qualitative Detection of Human Papillomavirus (HPV) Types 6,11,16,18,31,33,35,39,42,43,44,45,51,52,56,58,59, and 68 and Analysis of HPV DNA Low- and High-Risk Groups in Cervical Specimens: HPV Types 6/11/42/43/44 and 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. 2007 Digene Corporation

14. Dennis van Hamont,^{1,2} Maaïke A. P. C. van Ham,² Judith M. J. E. Bakkers,¹ Leon F. A. G. Massuger,² and Willem J. G. Melchers^{1*} Evaluation of the SPF₁₀-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. 2006, American Society for Microbiology

16. Maaïke A. P. C. van Ham,¹ Judith M. J. E. Bakkers,² Gonneke K. Harbers,² Wim G. V. Quint,³ Leon F. A. G. Massuger,¹ and Willem J. G. Melchers^{2*} Comparison of Two Commercial Assays for Detection of Human Papillomavirus (HPV) in Cervical Scrape Specimens: Validation of the Roche AMPLICOR HPV Test as a Means To Screen for HPV Genotypes Associated with a Higher Risk of Cervical Disorders 2005, American Society for Microbiology