

COMUNICACIÓN CORTA

Tipificación del virus del papiloma humano en muestras cervicales de 15 mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer, Año 2007

Typing of human papilloma virus in cervical samples of fifteen women that attended the National Institute of Cancer in December, 2007

Segovia E^I, *Mendoza LP^{II}

^IDepartamento de Patología Cervical, Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Paraguay

^{II}Departamento de Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es la segunda neoplasia maligna en la población femenina a nivel mundial siendo el virus de papiloma humano (HPV) la causa principal. El objetivo de este estudio preliminar fue determinar el tipo de HPV en mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer en Diciembre del 2007, por amplificación de cadena de la polimerasa asociado a digestión por enzimas de restricción (PCR-RFLP) y observar la frecuencia de otros factores de riesgo asociados al cáncer. HPV fue detectado en 14 de 15 mujeres con resultados anormales de citología y/o colposcopia. Ocho de las 14 mujeres fueron positivas para HPV de alto riesgo – HR HPV (tipos 16, 31, 58, 33, 45), presentando 6 de las 8 mujeres resultados de biopsia de neoplasia intraepitelial cervical I y III (CIN I y CIN III). Se observó un caso de infección múltiple con los tipos de HR-HPV 33 y 45. Fueron observados 7 casos con falta de concordancia entre los resultados de citología, colposcopia y biopsia, en los cuales la detección de tipos de HR-HPV contribuyó a identificar las mujeres con mayor riesgo de desarrollar CIN. Se observó en algunos casos la presencia de otros factores de riesgo para CIN, como el consumo de cigarrillo por 10 y 30 años y el uso de anticonceptivos orales por 20 años. En conclusión, los resultados preliminares sugieren que la detección de tipos de HPV por PCR-RFLP puede ser útil para orientar el manejo del paciente.

Palabras Claves: Tipificación de HPV, PCR-RFLP, muestras cervicales.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second malignant neoplasia in women population worldwide being the human papilloma virus (HPV) the main causative agent. The aim of this preliminary study was to determine the type of HPV in women that attended the National Institute of Cancer in December, 2007 by polymerase chain reaction associated with restriction enzymes digestion (PCR-RFLP) and to observe the frequency of other risk factors associated with cancer. HPV was detected in 14 of 15 women with abnormal results of cytology and / or colposcopy. Eight of 14 samples were positive for high risk HPV – HR HPV (types 16, 31, 58, 33, 45) and 6 of these women showed biopsy results of I and III cervical intraepithelial neoplasias (CIN I and CIN III). A case of multiple infections with 33 and 45 HR-HPV types was observed. In seven cases, a lack of concordance between the results of cytology, colposcopy and biopsy was observed. In these cases, the detection of HR-HPV types contributed to identify women with higher risk of developing CIN. In some cases, the presence of other risk factors for CIN was observed such as smoking for ten and thirty years and the use of oral contraceptives for twenty years. In conclusion, the

*Autor correspondiente: **MSc, Laura Mendoza**, Dpto. de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza .Asunción-Paraguay
Email: lauramt78@yahoo.com.mx

preliminary results obtained suggest that the detection of HPV types by PCR-RFLP can be useful to orientate the management of the patient.

Keywords: HPV typing, cervical samples, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es la segunda neoplasia maligna en la población femenina a nivel mundial presentándose más de 490.000 casos nuevos por año, ocurriendo el 80% en países en vías de desarrollo (1). El Paraguay ocupa el tercer lugar en la incidencia del cáncer de cuello uterino con una tasa de 53,2x100.000 mujeres entre los países latinoamericanos (2).

Estudios de cohortes prospectivos y de caso control sostienen que una infección persistente del virus de papiloma humano (HPV) es el factor de riesgo más significativo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (3).

Existen más de 100 tipos de HPV, de los cuales, aproximadamente 40 infectan las superficies mucosas del epitelio ano-genital y son clasificados como tipos de HPV de alto (HR-HPV) o bajo riesgo (LR-HPV) basados en su potencial oncogénico (3).

El grupo de LR-HPV comprende los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, los cuales, pueden causar cambios benignos o de bajo grado en células cervicouterinas, siendo los tipos de HPV 6 y 11 detectados en el 90% de las verrugas genitales(4). El grupo de HR-HPV comprende los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 que son detectados en más del 95% de los casos de cáncer de cuello uterino (5).

Aproximadamente la mitad de los hombres y mujeres sexualmente activas en algún momento de sus vidas están infectados con HPV, considerándose un problema de salud pública por ser la infección de transmisión sexual más frecuente (6-8).

Existen otros factores que pueden estar asociados con la persistencia de HPV y el desarrollo de cáncer de cuello uterino; como la inmunosupresión, el tabaco, las infecciones con *Chlamydia*, la multiparidad y el uso prolongado de anticonceptivos (9,10).

Entre los métodos utilizados para el *screening* de cáncer de cuello uterino el examen preventivo más común es el estudio citológico (*Papanicolaou-Pap*), el cual detecta las alteraciones celulares causadas por la infección viral (9). Otro método utilizado para el *screening* de cáncer de cuello uterino es la colposcopia realizada con ácido acético al 5%, la cual ayuda en la identificación de lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino aumentando la sensibilidad de la citología, siendo el diagnóstico de referencia de lesiones precancerosas la colposcopia con biopsia dirigida (11).

Los métodos convencionales mencionados anteriormente detectan la presencia de lesión escamosa intraepitelial pero no el tipo de HPV presente en la lesión, lo cual podría ser relevante en el manejo clínico de las lesiones cervicales y cáncer (12). Actualmente se han desarrollado métodos moleculares como el basado en la amplificación de cadena de la polimerasa (PCR) que asociado al polimorfismo de fragmentos de DNA obtenidos por enzimas de restricción (RFLP), permite detectar e identificar más de 30 tipos específicos de HPV (13).

El Paraguay posee una alta incidencia de cáncer de cuello uterino, sin embargo existen solo dos estudios epidemiológicos sobre tipificación viral de HPV por el método de PCR en cáncer de cuello uterino infiltrante (14,15).

Aún no existen datos de los tipos de HPV circulantes en la población general. A partir del año 2008 se encuentra disponible en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) el servicio de tipificación viral de HPV en muestras cervicales por el método de PCR RFLP.

El objetivo de este estudio preliminar descriptivo fue determinar el tipo de HPV presente en muestras cervicales de 15 mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPBS), en Diciembre del 2007, por el método de PCR-RFLP y la frecuencia de otros factores de riesgo asociados al cáncer de

cuello uterino, a fin de proporcionar datos que puedan contribuir a orientar el manejo clínico de la paciente, así como ampliar el conocimiento epidemiológico sobre los tipos de HPV circulantes en el Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

En este estudio fueron incluidas 15 mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer, cuyas muestras cervicales fueron remitidas al Laboratorio de HPV del IICS para realizarse la tipificación de HPV por el método de PCR-RFLP en Diciembre del 2007.

Las mujeres participantes fueron seleccionadas en forma consecutiva siguiendo criterios previamente establecidos que fueron; un diagnóstico citológico y colposcópico dentro del año correspondiente y sin histerectomía total. La edad promedio de las participantes fue de 29 ± 10 años (rango de 20 a 51 años).

A todas las participantes del estudio en el Instituto Nacional del Cáncer se les realizó una encuesta, a fin de describir la presencia de factores de riesgos asociados al cáncer.

Todos los datos fueron procesados respetando la confidencialidad de las participantes.

Diagnóstico citológico y colposcópico

El diagnóstico citológico y colposcópico fue realizado por el Departamento de Patología Cervical del Instituto Nacional del Cáncer del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP-BS).

Los resultados de citología fueron clasificados según la terminología de Bethesda 2001(16):

1. Sin alteraciones: negativa para lesión escamosa intraepitelial o malignidad (N-SIL).
2. ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto.
3. SIL bajo grado (L-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado.
4. SIL de alto grado (H-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.
5. Carcinoma.

Tipificación del virus de papiloma humano por el método de PCR-RFLP

La toma de muestra para el estudio de tipificación viral de HPV fue realizada por el Departamento de Patología Cervical del Instituto Nacional del Cáncer (MSPBS), posterior a la recolección del material cervical para el estudio citológico y previa a la aplicación del ácido acético para la colposcopia.

La toma de muestra se realizó utilizando un cepillo cónico especial, el cual fue colocado en un tubo que contiene una solución conservante que permite mantener la integridad de la muestra. Posteriormente la muestra fue remitida al Laboratorio de HPV del IICS para su procesamiento.

Primeramente se realizó la extracción del genoma viral (ADN) descriptas por Rabelo-Santos et al., 2005(17). Luego se realizó la amplificación del genoma del HPV por PCR con *primers consensus* (MY09 y MY11). Se siguieron las instrucciones de Rabelo-Santos et al., 2005 (17).

A fin de verificar la calidad del DNA extraído, todas las muestras negativas para el genoma de HPV fueron amplificadas por PCR utilizando *primers* específicos para B-globina, siguiendo el protocolo sugerido por Wanderlei-Silva et al., 2005 (18).

Para determinación los tipos de HPV por el método de RFLP, todas las muestras positivas para HPV fueron digeridas utilizando de 5 a 10 unidades de enzimas de restricción (Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, y Sau 3 AI) según la metodología descrita por Bernard et al, 1994(13). Los productos digeridos fueron analizados utilizando un gel de poliacrilamida 7% y los patrones de bandas obtenidos fueron comparados con un mapa de restricción de referencia (13).

Las mujeres con resultados positivos para HPV y diagnósticos citológicos y/o colposcópicos sugestivos de lesión escamosa intraepitelial fueron biopsiadas en el Departamento de Patología Cervical del Instituto Nacional del Cáncer (MSPBS).

RESULTADOS

Según el diagnóstico citológico de un total de 15 mujeres participantes, 5 presentaron resultados de NSIL (33%), 8 de LSIL (53%), 1 de HSIL (7%) y 1 de carcinoma (7%).

Con respecto a la citología, en 14 de las 15 muestras analizadas fue observada la presencia de HPV por el método de PCR. Se evidenció un 80% de mujeres positivas para HPV con un resultado de NSIL por citología y un 100% de positividad para HPV en mujeres con resultados de LSIL, HSIL y cáncer invasivo. Los resultados son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Detección de virus de papiloma humano (HPV) por el método de PCR-RFLP según estudios citológicos. N=15.

Citología	HPV Positivo (%)	Total de muestras
NSIL	4 (80)	5
LSIL	8 (100)	8
HSIL	1 (100)	1
Ca	1 (100)	1
Total	14 (93)	15

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial.

L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado.

H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

Ca: Carcinoma.

Fue realizada la tipificación de HPV por RFLP en 14 muestras de mujeres positivas para infección viral por PCR. Tres de las 14 muestras analizadas (21%) fueron positivas para HPV 16 y 5/14 muestras (36%) para otros tipos de HPV también considerados de alto riesgo oncogénico (HPV tipos 31, 58, 33, y 45). Cabe destacar, que fueron detectados 2 casos de tipificación de HPV indeterminados (2/14 muestras, 14%) y un caso de infección múltiple con los tipos de HPV 33 y 45 (1/14 muestras, 7%). Tres de las 14 muestras analizadas presentaron escasez de DNA HPV (carga viral) y no fue posible tipificarlas. Los datos son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Detección de tipos de HPV por el método de PCR-RFLP según estudios citológicos.

Citología	HPV Positivo	Tipificación viral
NSIL	4	31; 16; Indeterminado (a)
LSIL	8	58; 53; 16; 33; 16; Indeterminado; (33-45) ^(b) ; (a)
HSIL	1	58 (a)
Ca	1	(a)
Total	14	-

^(a) Muestra positiva para HPV por PCR, con escasez de material (DNA HPV) para realizar la tipificación viral.

^(b) Infección múltiple con los tipos de HPV 33 y 45.

En relación a los resultados de HPV según el diagnóstico citológico, colposcópico y de biopsia, es de interés destacar a continuación 7 casos, que presentaron resultados con falta de concordancia. Los resultados son mostrados en la Tabla 3.

Los casos 1, 2, 3, 4, presentaron resultados de NSIL por citología y colposcopia positiva. Con respecto al resultado de HPV y biopsia, los casos 1 y 2 fueron positivos para HPV de alto riesgo oncogénico (HPV tipos 16 y 31) y presentaron resultados de biopsia de CIN I + HPV y CIN III respectivamente, mientras que el caso 4 fue positivo para un HPV no

tipificable, observándose un resultado de biopsia de cervicitis crónica. No fue detectado infección por HPV en el caso 3. Los resultados son mostrados en la Tabla 3.

Los casos 5 y 6 correspondieron a mujeres con presencia de LSIL por citología y sin alteraciones por biopsia, sin embargo, ambos casos presentaron resultados positivos de colposcopia y de HPV de alto riesgo oncogénico.

En el caso 7 se presentó una falta de concordancia cito-colposcópica, observándose un resultado de LSIL por citología y uno negativo por colposcopia. Posteriormente en este caso se detectó HPV tipo 16 y se obtuvo un resultado de CIN I + HPV por biopsia. Los resultados son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de estudios de citología, colposcopia, biopsia y HPV de mujeres atendidas en el Instituto Nacional del Cáncer, en Diciembre 2007.

Nº	Edad	Citología	Colposcopia	HPV	RFLP/HPV	Biopsia
1	23	NSIL	Positiva	Positiva	16	CIN I + HPV
2	40	NSIL	Positiva	Positiva	31	CIN III
3	23	NSIL	Positiva	Negativa	-	-
4	21	NSIL	Positiva	Positiva	Escasez de material para tipificar	Cervicitis crónica
5	41	LSIL	Positiva	Positiva	58	Cervicitis crónica
6	20	LSIL	Positiva	Positiva	33; 45	Sin alteraciones
7	22	LSIL	Negativa	Positiva	16	CIN I + HPV

NSIL: Negativo para lesión escamosa intraepitelial; **LSIL:** lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **HSIL:** lesión escamosa intraepitelial de alto grado; **Ca:** carcinoma; **CIN I:** Neoplasia intraepitelial cervical grado I; **CIN III:** Neoplasia intraepitelial cervical grado III.

Con respecto a factores que pueden estar asociados con la persistencia de HPV y el desarrollo de cáncer de cuello uterino, se observó que de 10 mujeres positivas para HPV con resultados de biopsia anormales, 4/10 casos presentaron inicio de relación sexual temprana entre 15 a 16 años, 4/10 más de dos parejas sexuales, 5/10 multiparidad con más de 2 hijos, 3/10 consumo prolongado de cigarrillo durante medio, 10 y 30 años y 1/10 uso de anticonceptivos orales por 20 años. Los resultados son mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores de riesgo de cáncer de cuello uterino asociados a mujeres positivas para HPV con resultados de biopsia anormales.

Citología	Biopsia	Factores de riesgo asociados
NSIL	CIN I + HPV	IRS: 20 años; N°PS: 2; N°Embarazos: 2; TAO: -; TF: -
NSIL	CIN III	IRS: 17 años; N°PS: 3; N°Embarazos: -; TAO: medio año; TF: -
LSIL	CIN I	IRS: 15 años; N°PS: 2; N°Embarazos: 4; TAO: -; TF: -
LSIL	CIN I	IRS: 15 años; N°PS: 5; N°Embarazos: 3; TAO: -; TF: -
LSIL	CIN I + HPV	IRS: 19 años; N°PS: 1; N°Emb: 1; TAO: -; TF: -
LSIL	CIN I + HPV	IRS: 18 años; N°PS: 2; N°Embarazos: -; TAO: -; TF: -
LSIL	CIN I + HPV	IRS: 16 años; N°PS: 6; N°Embarazos: 1; TAO: -; TF: 1 año
LSIL	CIN III	IRS: 15 años; N°PS: 3; N°Embarazos: 4; TAO: -; TF: 10 años
HSIL	CIN III	IRS: 18 años; N°PS: 4; N°Embarazos: 5; TAO: -; TF: -
Ca	Carcinoma infiltrante grado II	IRS: 17 años; N°PS: 1; N°Embarazos: 5; TAO: 20 años; TF: 30 años

NSIL: Negativo para lesión escamosa intraepitelial; **LSIL:** lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **HSIL:** lesión escamosa intraepitelial de alto grado; **Ca:** carcinoma; **CIN I:** Neoplasia intraepitelial cervical grado I; **CIN III:** Neoplasia intraepitelial cervical grado III; **IRS:** inicio de relación sexual; **N°PS:** número de parejas sexuales; **TAO:** tiempo de consumición de anticonceptivos orales; **TF:** periodo de tiempo que fuma.

DISCUSIÓN

Mundialmente el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de tumor maligno en las mujeres, siendo en el Paraguay la causa más frecuente. En el presente estudio se realizó por PCR RFLP la tipificación viral de muestras cervicales de mujeres con resultados citológicos y colposcópicos normales y anormales.

Se observó un resultado positivo para HPV en 14 de las 15 mujeres, lo cual puede deberse a que con excepción del caso 5 todas las mujeres participantes poseían resultados de citología y/o colposcopia sugestivos de lesión escamosa intraepitelial (Tabla 3).

Se evidenció un caso de infección múltiple con los tipos 33 y 45 (1/14 muestras, 7%), lo cual puede atribuirse a que diferentes tipos de HPV comparten la misma vía de transmisión, por tanto tienden a ser transmitidos juntos, presentándose por ello, las infecciones múltiples de HPV con una alta frecuencia del 20 al 30% en mujeres de la población general (19).

Dos del total de casos positivos para HPV (14%) presentaron un resultado de tipificación indeterminada por RFLP. Estudios sugieren que estos resultados se deben generalmente a la presencia de una infección múltiple con más de dos tipos de HPV, lo cual da un patrón de restricción de difícil interpretación (20).

En relación al diagnóstico citológico y colposcópico, es de interés resaltar los casos 1 y 2 que presentaron resultados de citología de NSIL, de colposcopia positiva, de HPV de alto riesgo oncogénico y de biopsia de CIN I y CIN III respectivamente. El resultado observado puede deberse a que la citología tiene un porcentaje de falsos negativos aproximadamente de un 20%. (21) Estudios previos en concordancia con estos casos demuestran que la utilización de métodos moleculares que permitan realizar la tipificación viral complementaria a la citología aumentan los valores de sensibilidad de detección de lesión escamosa intraepitelial a casi un 100% (22).

El caso 4 corresponde a una mujer positiva para HPV con resultado negativo para SIL por citología/biopsia, lo cual puede atribuirse a que la técnica de PCR es muy sensible permitiendo detectar la presencia de infección viral aun en ausencia de lesión (22).

El caso 3 corresponde a una mujer con resultados de citología de NSIL, colposcopia positiva y HPV negativa. En un estudio de meta-análisis Mitchell et al., 1998, observaron que la colposcopia presentó una sensibilidad del 96% y una especificidad del 48% para distinguir entre tejidos normales y con lesión, lo cual sugiere que en este caso el resultado de colposcopia positiva pudo deberse a un falso positivo (23).

Cabe destacar que gracias al alto valor predictivo negativo mayor a 95% de los métodos basados en PCR para detección de HPV las mujeres con diagnóstico citológico de NSIL y negativas para dicho virus (caso 3) tienen un riesgo reducido de desarrollar lesión escamosa intraepitelial (22).

Los casos 5 y 6 correspondieron a mujeres con resultados de LSIL por citología, colposcopia positiva, HPV de alto riesgo oncogénico y sin alteraciones por biopsia. Considerando los resultados de citología, colposcopia y HPV el resultado de biopsia observado pudo deberse a que el área seleccionada para realizar dicho estudio pudo no ser la más representativa (24).

Cabe destacar que en el caso 6 se observó una infección múltiple con los tipos de HPV 33 y 45 considerados de alto riesgo oncogénico. Estudios demuestran que mujeres que presentan infecciones con múltiples tipos de HPV poseen un riesgo aumentado de desarrollar lesión escamosa intraepitelial, pero aún no está claro si el riesgo es mayor a la suma de los riesgos que posee cada tipo de HPV individual (9).

En el caso 7 se observó un resultado de citología de LSIL, colposcopia negativa, HPV tipo 16 y de biopsia de CIN I+HPV. En concordancia con este caso, estudios demuestran que en una frecuencia del 20 al 40% pueden observarse resultados de colposcopia falsos negativos en pacientes con un diagnóstico histológico de pre-cáncer, sugiriendo que la

toma aleatoria de más de una biopsia en ciertas ocasiones puede aumentar la sensibilidad de la colposcopia para detectar la presencia de lesión (24,25).

En relación a los datos obtenidos de tipificación viral, el HPV tipo 16 fue detectado en 3/14 casos de mujeres positivas para HPV. El estudio *ALTS Trial* de seguimiento por 2 años incluyendo 5060 mujeres con ASCUS y 542 mujeres con CIN III, demostró que mujeres infectadas con HPV 16 tienen 38 veces más riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino que las mujeres HPV negativas. Las mujeres infectadas con otros tipos de HPV oncogénicos presentan 7,2 veces más riesgo de cáncer (26).

Con respecto a otros factores de riesgo asociados al cáncer de cuello uterino como; inicio de relación sexual temprana, más de dos parejas sexuales, multiparidad, consumición prolongada de tabaco y anticonceptivos orales, debe considerarse que estudios previos demostraron que los mismos pueden duplicar o triplicar el riesgo de desarrollar lesiones pre-neoplásicas o neoplásicas en mujeres infectadas persistentemente con HPV de alto riesgo oncogénico (9).

En suma, los resultados de la serie de casos analizados demostraron que los datos de tipificación de HPV al ser utilizados juntos a los obtenidos en estudios citológicos y colposcópicos pueden aumentar la eficacia de detección de lesiones escamosas intraepiteliales, contribuyendo a resolver casos con falta de concordancia citológica y colposcópica, orientando el manejo clínico de la paciente. Cabe destacar, que mujeres que presentan factores de riesgo como consumo prolongado de tabaco y anticonceptivos orales, número elevado de parejas sexuales y multiparidad asociados a la infección persistente con tipos de HPV de alto riesgo oncogénico poseen un riesgo mayor de desarrollar lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisan P. Global cancer statistics 2002. *Cancer J Clin.* 2005; 55:74-108.
2. Lewis, Merle J. Análisis de la Situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Washington DC, 2004.
3. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005; 6:204.
4. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;3:3-13.
5. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2004;103(2):304-9.
6. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102:3-8.
7. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97: 1072-79.
8. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P et al. Persistent genital human papilloma virus infection as a risk persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-71.
9. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370: 890-907.
10. Kulasingam SL, Hughes JP, Kiviat NB, Mao C, Weiss NS, Kuypers JM, et al. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA.* 2002;288(14):1749-57.
11. De Vuyst H, Claeys P, Njiru S, Muchiri L, Steyaert S, De Sutter P, et al. Comparison of pap smear, visual inspection with acetic acid, human papillomavirus DNA-PCR testing and cervicography. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005;89(2):120-6.
12. Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8):3861-4.

13. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170:1077-85.
14. Kasamatsu E, Ascurra M, Hullin C, Nakajima T, Shozawa T. Detection and typing of human papillomavirus DNA in invasive squamous cell carcinoma of the cervix by polymerase chain reaction and its correlation with histopathological findings. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas* 1996;29(1-2):317-33.
15. Rolon PA, Smith JS, Munoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer.* 2000;85(4):486-91.
16. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al., The Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA,* 2002;267(16):2114-19.
17. Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SF, Sarian LO, Zeferino LC, Messias S et al. DNA recovery from Hybrid Capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *J Virol Methods.* 2005;126(1-2):197-201.
18. Wanderlei-Silva D, Nobre M, Silva Gonzaga R, Silva Viana L, and Ármalo Neto E. High quality DNA from human papillomavirus (HPV) for PCR/RFLPs. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2005 Jan;48(1):37-40.
19. Mendez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van der Brule AJ et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis.* 2005;192:1158-1165.
20. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005; 32:43-51.
21. Carvalho MOO, Almeida RW, Leite FMS. Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(2):121-5.
22. Schneider A, Hoyer H, Lotz B, Leistritz S, Kühne-Heid R, Nindl I et al. Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV. *Int J Cancer.* 2002; 89: 529–34.
23. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: Meta-analysis. *Obstet. Gynaecol.* 1998;91, 626-31.
24. Gage JC, Hanson VW, Abbey K, Dippery S, Gardner S, Kubota J et al. Number of cervical biopsies and sensitivity of colposcopy. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 264–72.
25. Pretorius RG, Kim RJ, Belinson JL, Elson P, Qiao YL. Inflation of sensitivity of cervical cancer screening tests secondary to correlated error in colposcopy. *J Low Genit Tract Dis.* 2006; 10: 5–9.
26. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM, for the ALTS Group. Human papillomavirus type 16 infections and two-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1066 –71.