

GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN MUJERES CON LESIONES DE CUELLO UTERINO

MAIRA ÁVILA, URANIA GENATIOS, RICARDO BLANCH, ZORAYA DE GUGLIELMO, ANDREÍNA FERNANDES, DAYAHINDARA VEITÍA, MARÍA CORRENTI

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR. INSTITUTO DE ONCOLOGÍA Y HEMATOLOGÍA. MPPS. SERVICIO DE GINECOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS

RESUMEN

OBJETIVO: Numerosos trabajos han demostrado que la infección persistente con algunos tipos de virus papiloma humano de alto riesgo incrementa el riesgo para desarrollar neoplasias intra-epiteliales cervicales de alto grado y progresión hacia el carcinoma de cérvix. En nuestro país esta patología constituye una de las principales causas de muerte por cáncer, el objetivo del presente estudio es realizar la tipificación del virus en 37 muestras de mujeres con lesiones intra-epiteliales de bajo y alto grado, que acudieron a consulta de cuello uterino del servicio de ginecología de nuestro hospital. **MÉTODO:** Se utilizó el sistema de hibridación reversa de INNO-LiPA HPV EXTRA Amp. **RESULTADOS:** En el estudio, el virus se detectó en todas las muestras. La infección con virus de alto riesgo en las lesiones intra epiteliales de bajo grado se observó en 69,57 %, siendo los tipos 16 y 51 los más prevalentes con 34,85 % cada uno, seguido de los tipos 31 y 52 con un 13,04 % cada uno. En cuanto a las de alto grado la infección se observó en el 92,86 %, siendo el 16 el más prevalente con un 57,14 %, seguido del tipo 51 con un 42,86 %. **CONCLUSIÓN:** Es importante mencionar, que estos estudios donde se incorporan métodos altamente sensibles en la identificación del ADN viral en conjunto con los programas de pesquisa convencionales pueden ayudar a mejorar el diagnóstico y manejo de aquellas pacientes con citologías cervicales anormales, dudosas y ambiguas.

PALABRAS CLAVE: Virus papiloma humano, lesión, intraepitelial, escamosa, bajo grado, alto grado, sistema, hibridación reversa.

SUMMARY

OBJECTIVE: In numerous studies have shown that persistent infection with certain types of human papyloma virus high risk increases the risk for developing cervical neoplasia intra epithelial denominated high grade and his progression to cervical carcinoma. Since in our country this disease is the leading cause of cancer death in our feminine population, the objective of this study was to perform the typing of the human papyloma virus in 37 samples of women with low or high grade squamous intraepithelial lesions, who attended in the consultation cervical gynecology service of the university hospital in the Caracas city. **METHOD:** In our work for this purpose we used the reverse hybridization system INNO-LiPAHPV Extra amp. **RESULTS:** In our study, the human papyloma virus was detected in all the samples. The high grade infection on less grade invasive intra epithelial lesions was observed in 69.57 %, with virus type16 and the 51 the most prevalent with 34.85 % each one, respectively. As for the classified high grade intra epithelial lesions the infection was observed in the 92.86 %, with virus type16 the most prevalent in our study with 57.14 %, followed by type 51 viruses with 42.86 %. **CONCLUSIONS:** It is important note that studies that incorporate the highly sensitive methods to identify the viral DNA in conjunction with the conventional screening programs can help us to improve the diagnosis and management of those patients with abnormal cervical cytology, uncertain and ambiguous.

KEY WORDS: Human papilloma virus, lesion, intraepithelial, squamous, low, high grade, system, reverse hybridization.

Recibido: 08/09/2012 Revisado: 19/11/2012

Aceptado para publicación: 07/02/2013

Correspondencia: Lic. Maira Ávila. Instituto de Hematología y Oncología. MPPS. Av. Minerva detrás de la Facultad de Odontología. UCV.

Tel: 02126050647. 04142519626.

E-mail: avilamaira@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cervical constituye la segunda causa de neoplasia y de muerte en las mujeres a nivel mundial, precedido solamente por el cáncer de mama que ocupa la primera causa de mortalidad ^(1,2). A nivel mundial, 500 000 nuevos casos son diagnosticados cada año, de los cuales se ha estimado que el 80 % se originan en los países en desarrollo y alrededor de 250 000 mujeres mueren anualmente debido a esta patología.

En Venezuela, el cáncer de cuello uterino es un problema de salud pública, representando en nuestra población femenina, la localización topográfica más frecuente, con una incidencia del 25,54 %, seguida de cáncer de mama (16,42 %) y de cáncer de colon y recto (7,03 %). Cada año se detectan 3 000 nuevos casos de cáncer cérvico-uterino en mujeres en edades comprendidas entre 25 y 64 años, considerado el grupo etario de mayor riesgo. La afección, además de ser la más frecuente, es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres venezolanas.

Esta patología de significativa magnitud en los países subdesarrollados, por el alto número de muertes que produce cada año, le ha dado al estudio epidemiológico que la relaciona con los virus papiloma humano (VPH) una importancia determinante desde el punto de vista de la salud pública, debido a que la infección con los VPH de alto riesgo se considera el factor etiológico más importante asociado con el desarrollo de cáncer de cuello uterino ⁽³⁾.

Estos virus son altamente específicos de especie y tejidos, mostrando un tropismo exclusivo por las células epiteliales de las mucosas y de la piel. Hasta el momento, se han identificado, en base a las secuencias de nucleótidos del genoma, más de 100 tipos virales o genotipos, de los cuales aproximadamente 40 han sido aislados del tracto ano-genital por causar lesiones y cáncer cervical ⁽⁴⁾.

Basados en su asociación con el cáncer cervical y las lesiones precursoras, los VPH pueden agruparse en tipos de alto y bajo riesgo oncogénico. Los tipos 6, 11, 42, 43 y 44, están comúnmente asociados con el condiloma acuminado y displasias menores, razón por la cual se les ha denominado de "bajo riesgo"; mientras que los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 están relacionados con neoplasia intraepitelial cervical (NIC), carcinoma *in situ* y carcinoma invasor, por lo que son considerados de "alto riesgo oncogénico". Incluidos en el grupo de alto riesgo están algunos tipos de VPH que se encuentran con menos frecuencia en los cánceres, sin embargo, se pueden hallar en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE). Algunos autores se refieren a estos tipos de VPH como de "riesgo intermedio". Los subtipos de bajo riesgo ocasionalmente se encuentran en los carcinomas cervicales ⁽⁵⁾.

Los estudios morfológicos y de biología molecular han demostrado una distribución diferencial de los VPH en las lesiones del tracto genital. Los VPH 6 y 11 son responsables del 79 % al 90 % de los condilomas y el tipo 16 se encuentra en aproximadamente el 50 % de los carcinomas invasores. Sin embargo, los pacientes pueden estar infectados al mismo tiempo con otros tipos de VPH de alto riesgo, como el 18, que también está muy relacionados con la neoplasia intraepitelial y el cáncer.

En general, muchas de las infecciones genitales causadas por estos virus se asocian con tumores benignos, que por lo general desaparecen espontáneamente después de un período de meses o años; considerándose una infección viral transitoria que puede permanecer indetectable en aproximadamente el 90 % de las mujeres ⁽⁶⁾. Solamente un pequeño número de casos de las lesiones benignas pueden progresar hacia neoplasia y cáncer. Una infección persistente con VPH de alto riesgo en aproximadamente el 5 % de los casos conduce al desarrollo de lesiones cervicales y al cáncer cervical, característica que

se debe en parte a la alta carga viral. Existen evidencias de la relación existente entre la carga viral y el diagnóstico de progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), NIC II o NIC III y el riesgo de desarrollar lesiones cervicales y cáncer cervical ⁽⁶⁻⁸⁾. Actualmente, los programas de pesquisa para el cáncer cervical se basan tradicionalmente en la citología o Papanicolaou, que es una prueba subjetiva que depende del criterio del observador y que puede mostrar sensibilidades que varían desde un 30 % hasta un 87 % y en los casos de los resultados indeterminados hay que repetir la prueba para proporcionar un diagnóstico certero ^(9,10). Por esta razón y debido a que en los últimos años se ha reconocido a los VPH de alto riesgo como agentes etiológicos del cáncer cervical se ha incrementado la demanda en el uso de pruebas que detectan el ADN viral para complementar el diagnóstico y manejo de aquellas pacientes con citologías cervicales anormales, dudosas y ambiguas ⁽¹¹⁾, así como para incrementar la eficacia de los programas de pesquisa del cáncer cervical ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Estas pruebas han demostrado tener sensibilidades mayores que las pruebas de citologías convencionales que van desde un 84 % hasta un 100 % ⁽¹⁵⁾.

Es por esta razón que el objetivo del presente trabajo consistió en realizar la detección y tipificación de VPH, en un grupo de 37 mujeres con LIE- BG o LIE- AG de malignidad, que acuden a la consulta de cuello uterino del servicio de ginecología del Hospital Universitario de Caracas, mediante el sistema de hibridación reversa de *INNO- LiPA Genotyping Extra*.

MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Grupo de Estudio

Se estudiaron 37 muestras de hisopados cervicales de mujeres con LIE-BG o LIE-AG de malignidad, que acuden a la consulta de cuello

uterino del servicio de ginecología del Hospital Universitario de Caracas.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron todas las pacientes sin distinción referentes a edad, primeras relaciones sexuales, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales, paridad, o infecciones previas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron todas las pacientes con histerectomía total y embarazadas. Previo a la toma de la muestra, las pacientes firmaron un consentimiento informado debido a que el protocolo de estudio está enmarcado dentro del proyecto FONACIT G- 2005000408, titulado: estudio multidisciplinario para el diagnóstico temprano y prevención de las infecciones de transmisión sexual y su asociación con procesos neoplásicos en población Venezolana: un problema de salud pública. Este proyecto fue evaluado por el comité de ética del Instituto de Biomedicina.

METODOLOGÍA

1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HISOPADO CERVICAL

Previamente, se obtuvieron las muestras para Papanicolaou, con el fin de realizar el análisis citológico, luego se recolectaron para la detección de VPH antes de la aplicación de ácido acético, lugol o tratamiento. Los hisopados se transportaron al laboratorio sin refrigeración en el transcurso de 4 h de tomada la muestra. La muestra se colectó de la zona de transformación, para recoger células cervicales desde el exocervix. Se insertó el hisopo, pasando la unión escamo columnar hasta el cervix, para colectando células cervicales exfoliadas desde el canal endocervical.

2. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH MEDIANTE EL SISTEMA DE HIBRIDACIÓN REVERSA DE INNO-LIPA.

Para la detección y tipificación del VPH, se realizó previamente la extracción del ADN a partir de los hisopados cervicales correspondientes a las LIE-BG o LIE-AG de malignidad. Para ello, se utilizó el sistema *QIA amp DNA mini Kit de QIAGEN*,[®] siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

A. DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE VPH

Una vez extraído el ADN, se procedió a realizar la detección y tipificación de VPH. Para ello se utilizó el *Kit INNO- LiPA HPV Genotyping Extra* que está basado en el principio de hibridación reversa. En este sistema, se amplifica parte de la región L1 del genoma de VPH y los amplificadores biotinilados desnaturalizados son hibridados con sondas de oligonucleótidos específicas, las cuales se inmovilizan en tiras de membranas que contienen 28 secuencias específicas de VPH. Después de la hibridación y el lavado astringente, la estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina se agrega a los híbridos biotinilados formados previamente. La incubación con el cromógeno BCIP/NBT produce un precipitado púrpura y los resultados se pueden interpretar visualmente.

B. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE PCR.

Reactivos	Conc. Final
AMP MIX	37,7 μ L
ENZ MIX	2,3 μ L

La amplificación se realizó en un termociclador *PTC- 150 MJ Research*, con las siguientes condiciones:

1. Descontaminación: 37 °C x 10 ´

2. Desnaturalización inicial: 94 °C x 9´, seguido de 40 ciclos de:

3. Desnaturalización: 94 °C x 30´

4. Hibridación: 52 °C x 45´´

5. Extensión: 72 °C x 45´´

6. Ext. Final: 72 °C x 5´

Una vez finalizada la corrida, se almacenaron los amplificadores a -20 °C hasta el momento de su uso.

C. PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Una vez amplificado el ADN viral, se realizaron las incubaciones de hibridación y de lavado astringente a 49 °C, en un baño de agua y con agitación constante. Las incubaciones para el revelado se realizaron a temperatura ambiente y en agitación constante.

Finalmente, la prueba de detección y tipificación se realizó con el ADN amplificado, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de asociación entre las variables de genotipo de VPH y tipo de lesión se usó la prueba de Chi- cuadrado con una $P < 0,05$. El análisis de los datos se realizó usando el programa SPSS, versión 13.0.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestra la frecuencia de los diagnósticos citológicos en el grupo de mujeres estudiadas y la detección de VPH por el método de hibridación reversa SPF10 de INNO-LIPA. El diagnóstico citológico que se observó con mayor frecuencia, fue el de LIE- BG con un 62,16 % (23/ 37), seguido de las LIE- AG con un 37,84 % (14/ 37).

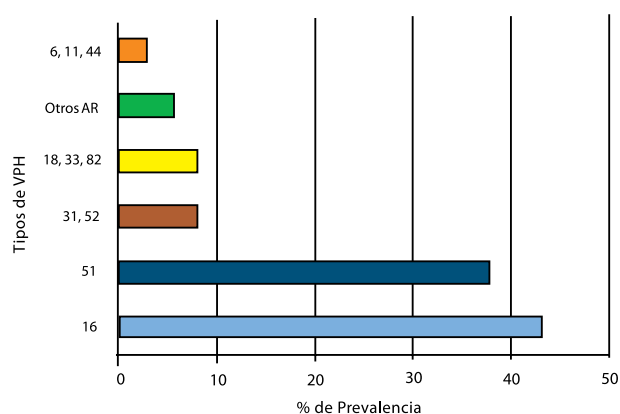
En general, en este estudio el virus de papiloma humano se detectó en el 100 % (37/37) de las muestras estudiadas, observándose que el 83,78 % (31/ 37) de las pacientes presentaban infección con virus de alto riesgo, seguido de 10,81 % (4/ 37) que presentaron infección con

Cuadro 1. Prevalencia de la infección por VPH en las muestras cervicales con diagnóstico citológico mediante el sistema de hibridación reversa SPF10- LiPA.

Diagnóstico citológico	f	%	Nº casos positivos	Nº casos negativos
LIE de bajo grado	23	62,16	23	0
LIE de alto grado	14	37,84	14	0
Total	37	100	37	0

virus de bajo riesgo y por último el 5,41 % (2/ 37) que presentaban infección mixta con tipos de bajo y alto riesgo oncogénico (Cuadro 2).

En las muestras analizadas se detectaron 12 genotipos de alto riesgo y 3 genotipos de bajo riesgo oncogénico. Entre los genotipos de alto riesgo, el 16 se encontró en el 43,24 % (16/37) de las muestras, seguido del tipo 51 con un 37,84 % (14/ 37), luego los tipos 31 y 52 con 8,11 % (3/37) cada uno, los tipos 18, 33 y 82 con 5,41 % (2/ 37) cada uno y por último los genotipos 39, 56, 58, 59, 73 con un 2,70 % (1/ 37) cada uno. En cuanto a los genotipos de bajo riesgo oncogénico, el VPH tipo 6 se encontró en el 8,11 % (3/ 37) de las muestras estudiadas, al igual que los genotipos 11 y 44 (Figura 1).

**Figura 1.** Distribución de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo en las pacientes con LIE de bajo y alto grado.**Cuadro 2.** Prevalencia de los Genotipos de VPH detectados mediante el sistema de hibridación reversa SPF10- LiPA en pacientes con LIE- BG o LIE- AG.

	Tipos de VPH			
	Bajo Riesgo	Alto Riesgo	Mixto	Total
Sistema SPF10 LiPA	4/37	31/37	2/37	37/37
	(10,81 %)	(83,78 %)	(5,41 %)	(100 %)

Cuando se realizó el análisis de detección y tipificación del virus de acuerdo al tipo de lesión, se observó que 69,57 % (16/ 23) de las LIE- BG presentaban infección con virus de alto riesgo oncogénico, seguido de un 17,39 % (4/23) que presentaron infección con virus de bajo riesgo y por último un 13,04 % (3/23) donde se evidenció la presencia de infecciones mixtas con virus de bajo y alto riesgo oncogénico. En estas muestras se detectaron 9 genotipos de alto riesgo oncogénico y 3 genotipos de bajo riesgo oncogénico. Los genotipos 16 y 51 de alto riesgo oncogénico se hallaron en el 34,78 % de las muestras estudiadas, seguidos de un 13,04 % (3/23) correspondiente a los tipos 31 y 52, el tipo 33 se evidenció en el 8,70 % (2/23) de las muestras y por último los tipos 18, 39, 56 y 58 se hallaron cada uno en el 4,35 % (1/23) de las muestras. En cuanto a los VPH de bajo riesgo oncogénico, los genotipos 6, 11 y 44 se encontraron, cada uno, en un 13,04 % de las pacientes estudiadas (Figura 2). En tres de las lesiones evaluadas, se evidenció co-infección de los virus de bajo riesgo con los de alto riesgo oncogénico (16, 51 y 52).

En el análisis de detección y tipificación de las LIE- AG se encontró la presencia de infección con virus de alto riesgo oncogénico en el 92,86 % (13/14) de las muestras estudiadas y en un solo caso (7,14 %) se evidenció la presencia de infección con el tipo 6, considerado de bajo riesgo oncogénico. Es importante mencionar, que en 6 de estas lesiones se detectó la presencia

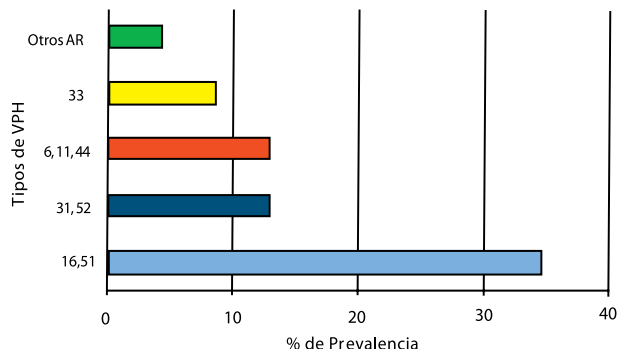


Figura 2. Distribución de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo en las pacientes con LIE-BG.

de infecciones con varios tipos de alto riesgo oncogénico (Cuadro 3).

En las LIE- AG se lograron detectar 6 genotipos de alto riesgo, entre ellos el más prevalente fue el tipo 16 con un 57,14 % (8/14), seguido del tipo 51 con un 42,86 % (6/ 14), el tipo 82 con un 14,29 % (2/14), y por último los tipos 18, 59 y 73 cada uno con un 7,14 %, respectivamente. El VPH tipo 6 se evidenció en una sola muestra (7,14 %).

En general en este estudio, tanto las LIE-BG como las LIE- AG, se comportan de manera independiente del tipo de VPH detectado cuando se contrastan todos los casos evaluados. Sin embargo, si se observa una asociación significativa ($P < 0,05$) al relacionar los tipos de

Cuadro 3. Prevalencia de los Genotipos de VPH detectados mediante el sistema de hibridación reversa SPF10-LiPA en pacientes con LIE- AG.

	Tipos de VPH			
	Bajo riesgo	Alto riesgo	Mixto	Total
Sistema	1/14	13/14	0	14/14
SPF10 LiPA	(7,14 %)	(92,86 %)	(0 %)	(100 %)

VPH alto riesgo agrupados por series específicas y el tipo de lesión, aunque no se puede definir en qué grupo está efectivamente la mayor asociación. La mayor frecuencia se aprecia en el grupo conformado por el genotipo 16 en relación con otros tipos de alto riesgo.

DISCUSIÓN

La relación causal entre la infección por ciertos tipos de VPH y el cáncer cervical está bien establecida^(3,16-18), debido a que la infección con genotipos de alto riesgo se ha demostrado en casi el 100 % de los carcinomas cervicales⁽¹⁹⁾, y además se ha observado que la infección persistente con algunos de estos genotipos incrementa el riesgo de desarrollar enfermedad pre-invasiva de alto grado⁽²⁰⁾.

Es por esto, que en los últimos años ha cobrado más valor los estudios donde se implementan pruebas de biología molecular para la detección del ADN viral de alto riesgo, en conjunto con las técnicas clásicas ya conocidas como la citología, con el fin de mejorar los programas de pesquisa para el cáncer cervical, así como el manejo de aquellas mujeres con citologías alteradas y el monitoreo de mujeres después de un tratamiento para un diagnóstico de neoplasia intra-epitelial de alto grado (NIC)⁽²¹⁻²⁴⁾.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo consistió en realizar la detección y tipificación de VPH en un grupo de 37 mujeres con diagnóstico de LIE- BG o LIE- AG utilizando el sistema de hibridación reversa de INNO- LiPA, que contiene un juego de oligonucleótidos (SPF10) que amplifica un fragmento de 65-bp de la región L1 del genoma de VPH⁽²⁵⁾. Se considera que este método es más sensible para la detección viral debido a que amplifica un fragmento de menor tamaño y a diferencia de otros sistemas que se basan en la amplificación de señal, con esta metodología se pueden identificar específicamente los genotipos que se encuentran en una muestra determinada. Tal identificación

se realiza mediante un ensayo de hibridación reversa donde los amplificadores biotinilados resultantes son desnaturalizados e hibridados con sondas de oligonucleótidos específicos para 28 genotipos del virus. Adicionalmente, un par de oligonucleótidos se agregan para la amplificación del gen HLA-DPB1 con el fin de monitorear la calidad del material extraído de la muestra.

En este estudio, la infección con VPH-AR se observó en la mayoría de las lesiones analizadas (73,91 % de las pacientes con LIE-BG y en el 92,86 % con LIE-AG), lo que concuerda con otro estudio realizado en nuestro país, donde se detectó la infección en el 66,9 % de las pacientes que presentaban LIE-BG y en el 83,7% de las pacientes con LIE-AG⁽²⁶⁾.

Por otra parte, se pudo observar que los VPH 16 y 51 fueron los genotipos de alto riesgo más prevalentes tanto en las pacientes que presentaban LIE-BG, como aquellas con LIE-AG. Para el caso de las LIE- BG, el VPH-16 al igual que VPH-51 se encontró en el 34,78 % de los casos. En las LIE-AG se observó el VPH-16 en un 57,14 %, seguido de VPH-51 con un 42,86 %, lo que concuerda con un estudio realizado en nuestro país⁽²⁶⁾, donde se encontró que el tipo 16 es el más prevalente, con un 20,8 % para las LIE-BG y un 37,4 % para las LIE-AG. Es importante mencionar, que esta prevalencia es similar a la reportada en otros países en vías de desarrollo, de América Central y Sur América donde se reporta hasta un 65 % de infección con VPH 16 en los casos de carcinoma cervical; en algunas regiones de África se ha registrado un 64 % de prevalencia para el VPH 16^(3,27).

En nuestro caso particular, al analizar la detección de otros VPH-AR, se observa que el tipo 51 estuvo presente en un alto número de muestras, comparado con otros tipos de alto riesgo, lo cual lo sugiere como un posible factor etiológico importante, al igual que el VPH tipo 16 en la progresión de lesiones de bajo y alto grado hacia el cáncer cervical.

Cabe destacar que el conocimiento generado

de estos estudios que utilizan nuevas tecnologías en conjunto con las tradicionales, como la citología cervical o Papanicolaou, proporcionan importantes indicios acerca de los mecanismos genéticos de inicio y progresión de las lesiones de neoplasia intraepitelial, así como un mejor entendimiento del comportamiento y manejo del cáncer cervical, lo que es de suma importancia en nuestra población debido a la alta incidencia de esta patología y la alta prevalencia de la infección por el VPH.

En este estudio se pudo observar un predominio de los VPH de alto riesgo oncogénico, siendo los genotipos 16 y 51 los que se encontraron con más frecuencia tanto en las LIE- BG como en las LIE- AG de malignidad.

En las LIE- BG en algunos casos se pudo evidenciar co-infección con tipos virales de bajo riesgo, no así para las LIE-AG donde se observó en casi todas las muestras analizadas, solo la presencia de tipos virales de alto riesgo.

El empleo de técnicas altamente sensibles como el sistema de hibridación reversa de INNO-LiPA, representa un aporte importante especialmente en el manejo y seguimiento de pacientes con LIE- BG o AG infectadas con VPH de alto riesgo oncogénico que pudieran progresar hacia cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen principalmente a las pacientes que gentilmente participaron en este estudio, al personal de la consulta de cuello del servicio de ginecología del Hospital Universitario de Caracas y al Lic. Armando Rodríguez por su colaboración en el análisis estadístico.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Misión Ciencias LPL- 20070001088 y el Ministerio del Poder Popular para la Salud.

REFERENCIAS

1. Parkin D, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999;49:33-64.
2. Jin, X, Cash J, Kennedy A. Human papillomavirus typing and the reduction of cervical cancer risk. *Cleveland Clin J Med.* 1999;6:533-539.
3. Bosch F, Manos M, Munoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:796- 802.
4. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 2000;19:1-5.
5. Burd E. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.
6. Ho G, Burk R, Klein S, Kadish A, Chang C, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1365-1371.
7. Moberg M, Gustavsson I, Gyllenstein U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma *in situ*. *Int J Cancer.* 2004;112:854-859.
8. Rajeevan M, Swan D, Nisenbaum R, Lee D, Vernon S, Ruffin M, et al. Epidemiologic and viral factors associated with cervical neoplasia in HPV-16 positive women. *Int J Cancer.* 2005;115:114-120.
9. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening results from women in a high- risk province of Costa Rica. *JAMA.* 2000;28(31):87-93.
10. Cuzick JG, Ferry L, Ho T, Hollingworth T, Anderson M. Human papillomavirus type 16 in cervical smears a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 1992;339(8799):959-960.
11. Josefsson A, Magnisson P, Yitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral

- load of human papillomavirus 16 a determinant for development of cervical carcinoma in situ: A nested case-control study. *Lancet*. 2000;355:2189-2193.
12. Swan D, Tucker R, Tortolero- Luna G, Mitcel M, Wideroff L, Unger E, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number in dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1030-1034.
 13. Van Duin M, Snijders P, Schrijnemakers H, Voorhorst F, Rozendal L, Nobbenhuis M, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: An indicator of CIN II/ III and viral clearance. *Int J Cancer*. 2002;98:590-595.
 14. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*. 2002;360(9328):228-229.
 15. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(6):464-474.
 16. Koutsky LA, Holmes CW, Critchlow CE, Stevens J, Paavonen AM, Beckmann TA, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*. 1992;327:1272-1278.
 17. Lehtinen MT, Luukkaala KL, Wallin J, Paavonen S, Thoresen J, Dillner M, et al. Human papillomavirus infection: Risk for subsequent development of cervical neoplasia and associated population attributable fraction. *J Clin Virol*. 2001;22:117-124.
 18. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass DM, Cadell B, Rush D, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:958-964.
 19. Walboomers JM, Jacobs MM, Manos FX, Bosch JA, Kummer KV, Shah PJ, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-19.
 20. Kjaer SK, vanden Brule G, Paul EI, Svare ME, Sherman BL, Thomsen M, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: Population based prospective follow-up study. *BMJ*. 2002;325:572-576.
 21. Bulkman NW, Rozendaal PJ, Snijders FJ, Voorhorst AJ, Boeke GR, Zandwijken FJ, et al. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: Design, methods and baseline data of 44 102 women. *Int J Cancer*. 2004;110:94-101.
 22. Cuzick J, Szarewski H, Cubie G, Hulman H, Kitchener D, Luesley E, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: The HART study. *Lancet*. 2003;362:1871-1876.
 23. Zielinski GD, Bais TJ, Helmerhorst RH, Verheijen FA, de Schipper PJ, Snijders FJ, et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: Review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv*. 2004;59 (7):543-553.
 24. Zielinski GD, Snijders L, Rozendaal FJ, Voorhorst AP, Ronsink FA, de Schipper J, et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: Long-term follow-up data and clinical relevance. *J Pathol*. 2001;195:300-306.
 25. Kleter BLJ, van Doorn J, ter Schegget L, Schrauwen K, van Krimpen M, Burger B, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of ano genital human Papillomaviruses. *Am J Pathol*. 1998;153:1731-1739.
 26. Correnti M, Medina F, Cavazza M, Rennola A, Avila M, Fernandes A. Human Papillomavirus (HPV) type distribution in cervical carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Venezuelan women. *Gynecol Oncol*. 2011;121:527-531.
 27. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against with human papillomavirus types shall we vaccinate and screen the international perspective. *Int J Cancer*. 2004;111(2):278-285.