

Genotipificación del virus de papiloma humano en mujeres con hallazgo citológico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL) o de significado indeterminado (ASC-US) en Bogotá, Colombia

Yeny Alexandra Farfán-Vargas¹, Dabeiba Adriana García-Robayo², Yazmín Arias-Murillo³, Olga Lucía Morales³, Mario Isaza³, Fabio Ancízar Aristizábal-Gutiérrez^{1*}

¹ Grupo de Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia, *Correo electrónico: faaristizabal@unal.edu.co.

² Centro de Investigaciones Odontológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C., Colombia.

³ Laboratorio Clínico, Clínica Colsanitas, S. A., Bogotá, D. C., Colombia.

Recibido para evaluación: 8 de febrero de 2010.

Aceptado para publicación: 28 de abril de 2010.

RESUMEN

El virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo asociado al cáncer cervical, y es la causa de muerte más común por cáncer entre las mujeres en Colombia. Por tanto, crece el interés a nivel mundial y nacional por mejorar las estrategias de control y diagnóstico de la infección; incluyendo técnicas de diagnóstico molecular que identifiquen y diferencien tipos virales específicos para así tener mejor entendimiento de la dinámica del virus en la historia natural de la infección por VPH. En el presente trabajo se detectó el VPH en 363 pacientes diagnosticadas con lesiones ASC-US o LSIL en su citología, pertenecientes al programa de tamizaje de cáncer de cérvix de la EPS Sanitas. Sólo a 302 de estas muestras se les pudo realizar genotipificación por Reverse Line Blot, de éstas el 20,5% (62/302 pacientes) fueron positivas para VPH; los tipos virales de alto riesgo estuvieron presentes en el 82,2% y los de bajo riesgo, en el 17,8%. Por primera vez se realiza un acercamiento a la descripción de tipos virales específicos, encontrados en muestras con diagnóstico citológico de ASC-US o LSIL en Bogotá.

Palabras clave: infecciones por papillomavirus, sondas ADN-VPH, neoplasias del cuello uterino.

SUMMARY

Genotyping human papillomavirus in patients with low-grade squamous intraepithelial lesion or atypical squamous cells of uncertain significance (ASC-US) in Bogotá, Colombia

Human papillomavirus (HPV) is the principal risk factor associated with cervical cancer, the most common malignancy among women in Colombia. Therefore, a growing concern globally and nationally to improve strategies to control and diagnosis of infection, including molecular diagnostic techniques to identify and differentiate specific HPV types thus have a better understanding of the dynamics of the virus in history natural infection. In the present work was performed HPV detection and genotyping in 302 of 363 patients who normally attended the screening program of the EPS Sanitas, and were subsequently diagnosed with ASC-US lesions. We found HPV in 20.5% (62/302 patients) divided into 82.2% for high-risk viral types and 17.8% for low risk. For the first time was a description of specific viral types found in samples of ASC-US in Bogotá.

Key words: DNA probes, HPV, papillomavirus infections, cervical intraepithelial neoplasia.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo (1). El agente etiológico asociado al cáncer cervical es el virus de papiloma humano (VPH), esencialmente los tipos oncogénicos o de alto riesgo; esta infección es una de las más prevalentes en cuanto a infecciones de transmisión sexual (ITS) en el mundo (2, 3). Una de las características de la historia natural del cáncer cervical es que en más del 50% de pacientes con lesiones de bajo grado regresan, mientras que pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer tienen una baja probabilidad de regresión; sin embargo, no es del todo claro porque unas pacientes regresan y otras progresan (4). Por esta razón, es importante desarrollar estrategias que lleven al conocimiento de factores virales moleculares con valor predictivo, con capacidad para indicar qué personas muestran alto riesgo de desarrollar este tipo de patologías, esto con el fin de implementar medidas de prevención, seguimiento e intervención.

El propósito de este trabajo fue genotipificar el VPH en la población de estudio e implementar la técnica de “Reverse Line Blot” (RLB), ensayo, basado en hibridación reversa a gran escala, que permite la identificación de 37 genotipos del virus VPH, previa amplificación de las muestras por PCR con iniciadores GP5+/Bio-GP6+ (5). Además, describir la presencia de los factores frecuentemente relacionados con la infección por VPH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

La población de estudio consistió en pacientes usuarias del programa de tamizaje de cáncer de cuello cervical de la entidad promotora de salud (EPS) Sanitas, pertenecientes al programa de detección temprana de cáncer de cuello uterino, en la ciudad de Bogotá (Colombia), que consultaron entre octubre de 2006 y enero de 2008.

El tamaño muestral fue definido con muestreo secuencial por conveniencia, durante un período de 16 meses. El tipo de muestreo fue consecutivo por conveniencia.

Se incluyeron pacientes entre 18 y 69 años, con reporte de citología ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) o LSIL (lesión escamosa intraepitelial de bajo grado), sin antecedentes de alteración citológica previa a la citología actual, que aceptaron participar voluntariamente en el estudio mediante la firma del consentimiento informado. Se excluyeron mujeres que habían recibido vacunación contra el VPH, quienes presentaban enfermedades inmunosupresivas o neoplasias y antecedentes de histerectomía o embarazo.

A todas las participantes se les realizó una encuesta para la recolección de datos socio-demográficos, reproductivos y de comportamiento sexual. Así mismo, se tuvo en cuenta el informe histopatológico.

Este estudio correspondió a una investigación con riesgo mínimo, de acuerdo con la clasificación establecida por el Ministerio de Salud en la resolución 8430/93, debido a que realizaron procedimientos habituales para la obtención de muestras biológicas.

Muestras biológicas

Se practicó a las pacientes exploración endocervical para obtener exudado cervical con citocepillo, posterior inmersión de las muestras endo- y ectocervicales en el medio para citología en fase líquida (CFL) (PreservCyt®); éstas fueron almacenadas a 4 °C.

Extracción y evaluación de la calidad del ADN

La extracción de ADN de las muestras se realizó por el método de fenol-cloroformo descrito por Sambrook (6). Se evaluó la calidad del ADN de las muestras empleando como indicador la amplificación de un fragmento de 110pb del gen β -globina humano, mediante los iniciadores PCO3 y PCO4 descritos por De Roda Husman (7).

La reacción de PCR se realizó en el termociclador My Cyclyer® de BioRad, en un volumen final de 25 μ L conteniendo 1X Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂ (Promega), 0,75 mM dNTPs (Promega), 0,75mM de cada primer (Invitrogen), 1 U Taq Polimerasa (Promega) y 5 μ L de ADN. Cada uno de los 40 ciclos de amplificación se desarrolló de la siguiente forma: 94 °C por 1 min; 52 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. La primera denaturación se realizó a 94 °C por 4 min y la elongación final por 10 min. Como control positivo se empleó ADN linfocitario y como control negativo agua destilada.

Todos los amplímeros fueron analizados en gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio 0,5 μ g/ μ L. El corrido se realizó en el equipo de electroforesis Power PAC® 3000 de BioRad a 80V durante 1 h. Por último, el producto de amplificación se detectó en el digitalizador de geles GelDoc® 1000/2000 de BioRad.

Detección genérica de vph

La detección genérica de VPH se realizó por PCR GP5+/GP6+ según el procedimiento descrito por De Roda Husman (7), para obtener un fragmento de 142 pb. La reacción de PCR se realizó en el termociclador My Cyclyer® de BioRad, en un volumen final de 50 μ L conteniendo las siguientes concentraciones de reactivos Buffer 1X (Promega), MgCl 3 mM (Promega), dNTPs 10 mM (Promega), de cada primer 0,25 μ M (Invitrogen), 0,4 U Taq Polimerasa (Promega) y 5 μ L de ADN. Cada uno de los 40 ciclos de amplificación se desarrolló de la siguiente forma: 94 °C por 1 min; 40 °C por 2 min y 72 °C por 1,5 min. La primera denaturación se realizó por 4 min y la elongación final por 10 min. Como control positivo se empleó pBR322 VPH 16 y 18 y como control negativo agua destilada.

Genotipificación de VPH mediante Reverse Line Blot

El método de tipificación utilizado está basado en hibridización reversa, utilizando un sistema miniblotted sobre el producto de PCR, obtenido después de realizar amplificación con PCR GP5+/BIO-GP6+. Este método de tipificación es denominado Reverse Line Blot (RLB), que permite la identificación de 37 genotipos de VPH. Los tipos virales que fueron determinados son los siguientes: VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 72, 73, 82, 83, 84, 82, 71, 81, CP6108. Las oligosondas utilizadas para este fin fueron las reportadas por Van den Brule (5) (tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de las oligosondas usadas para la tipificación por RLB.

Nº	Tipo	Secuencia
1	6	TCCGTAACATCATCTTCCA
2	11	TCTGTGTCTAAATCTGCTAC
3	16	CATTATGTGCTGCCATATC
4	18	TGCTTCTACACAGTCTCCT
5	26	GTACATTATCTGCAGCATC
6	31	GCAATTGCAAACAGTGATAC
7	33	TGCACACAAGTAACTAGTGA
8	34	TTTTCAGTTTGTGTAGGTACA
9	35	CTGCTGTGTCTTCTAGTGA
10	39	ATAGAGTCTTCCATACCTTC
11	40	AGTCCCCCACACCAACC
12	42	TGGTGATACATATACAGCTG
13	43	TCTACTGACCCTACTGTG
14	44	TACTAGTGAACAATATAAGCA
15	45	TAATTTAACATATATGTGCCTC
16	51	TGCTGCGGTTTCCCCAA
17	52	GAATACCTTCGTCATGGC
18	53	TGTCTACATATAATTCAAAGC
19	54	CACGCAGGATAGCTTTAAT
20	55	TCAGTCTCCATCTACAACAT
21	56	CAGAACAGTTAAGTAAATATG
22	57	CCACAGAACTAATATATAAAG
23	58	TATGCACTGAAGTAACTAAG
24	59	TCTACTACTGCTTCTATTCC
25	61	CCCCCCTGTATCTGAAT
26	66	AGCTAAAAGCACATTAECTAA
27	68	CTGAATCAGCTGTACCAAT
28	70	GAAACGGCCATACCTGCT
29	72	AGCGTCCTCTGTATCAGAA
30	73	ACAGGCTAGTAGCTCTACT
31	82 MM4	ACTGCTGGTACTCAATCTG
32	83 MM7	AGCGTCCTCTGTATCAGAA
33	84 MM8	TGCTACCAACACCGAATCA
34	82 IS39	TGCTACTCCATCAGTTGC
35	CP6108	CTTCCCAGTCTGCCACA
36	71 CP8068	TGCTACCAAACTGTTGAG
37	81 CP8304	GCTACATCTGCTGCTGC

Análisis de datos

Para efectos del análisis estadístico se elaboró una base de datos en formato xls. Microsoft Excel®, la cual fue debidamente depurada para evitar sesgos de digitación. El procesamiento de la información se realizó mediante un análisis descriptivo, univariado, construyendo tablas y gráficas, de las variables cualitativas de las cuales se obtuvo la distribución porcentual de frecuencias.

También se analizaron las frecuencias de las variables sociodemográficas, resultados de la biopsia y presencia de virus en múltiple infección e infección única. Las pruebas se evaluaron a un nivel de significancia del 5% ($p < 0,05$). Utilizando el software STATA 10.1

RESULTADOS

De las 363 muestras colectadas, incluidas inicialmente se excluyeron 61, dado que posiblemente por factores asociados a su manejo o procesamiento no fue posible aislar de ADN de calidad apropiada y en buena cantidad; por ello no amplificaron para el gen control β - globina y, por tanto, no fueron procesadas mediante el Reverse Line Blot. Las 302 muestras restantes fueron procesadas por esta técnica para realizar la detección y genotipificación para VPH. Restringiendo el análisis a las muestras analizadas por RLB, la edad de estas participantes varió entre los 18 y 69 años con una media de 31 años. Su distribución se puede observar en la tabla 2. La mayor parte de las mujeres encuestadas afirmaron ser solteras y el 41% de las participantes tenían estudios universitarios. Sólo el 0,3% representado por una de ellas, no había cursado ningún tipo de estudio. Los resultados histopatológicos de estas 302 pacientes se observan en la tabla 3.

Tabla 2. Características generales de la población.

Total	N° 302	% Total 100	Proporción de mujeres positivas para DNA de VPH		
			% DNA VPH 20,1	% Alto riesgo 13,9	% Bajo riesgo 6,1
Edad					
< 24	67	22,1	31	22,1	8,8
25-34	105	34,7	21	16,4	4,6
35-44	60	19,8	13	11,4	1,6
45-54	49	16,2	12	8	4
> 55	21	6,9	19	19	0
Escolaridad					
Baja	24	7,9	5	2,5	2,5
Intermedia	147	48,6	42	36,2	5,8

(Continúa)

Tabla 2. Características generales de la población (*continuación*).

Total	N° 302	% Total 100	Proporción de mujeres positivas para DNA de VPH		
			% DNA VPH	% Alto riesgo	% Bajo riesgo
			20,1	13,9	6,1
Alta	131	43,5	38	30,6	7,4
Uso anticonceptivos					
Barrera	26	8,6	23	19,1	3,9
Hormonales	51	16,7	20	20	0
Ninguno	158	52,3	24	20,2	3,8
Tabaquismo					
Sí	90	29,8	17	13,6	3,4
No	212	70,2	22	18,2	3,8
Estrato socioeconómico					
1	13	4,3	31	23,25	7,75
2	59	19,5	13	11,3	1,7
3	148	49	20	16,6	3,4
4	60	19,8	25	18,3	6,7
5	17	5,6	23	23	0
6	5	1,6	20	20	0

Tabla 3. Análisis del reporte de biopsias.

Reporte biopsia	Frecuencia	VPH Positivas	VPH Negativas	Prevalencia
Normal	148	32	116	21,6%
Bajo grado	105	22	83	21,0%
Alto grado	14	1	13	7,1%
N/A	35	7	28	20,0%
Total	302	62	240	100%

Respecto al método de anticoncepción utilizado, el 52,3% afirmó no hacer uso de ningún tipo de anticonceptivo. Sólo el 8,6% hacía uso de un método de barrera. El número de compañeros sexuales varió de uno a quince, y el 30,9% correspondió a la respuesta de una pareja. La mediana se ubicó en dos compañeros sexuales. Al preguntar por el número de parejas sexuales en los últimos dos años, más de la mitad de las participantes contestaron tener una sola pareja.

De las 302 pacientes, incluidas en este estudio 62 (20,5%), tenían presencia del virus del papiloma humano (VPH); y de éstas el 69,3% estaban infectadas con virus de alto riesgo únicamente, el 17,8% estaban infectadas con virus de bajo riesgo únicamente y 12,9% con tipos virales de alto y bajo riesgo; estas últimas con infección mixta (12,9%) se agruparon dentro de los tipos de alto riesgo.

Infecciones únicas (infección con un solo tipo viral) se detectaron en 39 mujeres (12,9% de las 302 mujeres incluidas en el estudio y 62,9% de las mujeres VPH positivas). Entre estas mujeres, los tipos virales más comunes fueron VPH 16 (25,5% de las mujeres con infección única), VPH 52 (21%) y VPH 18 (15%). Los tipos más frecuentes dentro del grupo de bajo riesgo fueron VPH 40 (5,1%) y VPH 26 (3%). Por otro lado, las infecciones múltiples (infecciones con dos o más tipos virales) se evidenciaron en 23 mujeres (7,6% de las 302 mujeres incluidas en el estudio y 37,1% de las mujeres VPH positivas) (tabla 4).

Tabla 4. Tipos virales de alto riesgo en múltiple infección.

Número de tipos virales	Tipos virales de alto riesgo
4	52-56
3	16-66
3	59-66
3	52-59
2	51-56
2	66-68
2	52-59-66
2	16-35
2	16-52

DISCUSIÓN

Actualmente, en Colombia no se han evaluado factores que actúen como determinantes de la infección por VPH en mujeres con diagnóstico ASC-US o LSIL en su citología, y a nivel mundial existen varios estudios acerca de dicha prevalencia, pero aún no hay ningún metaanálisis de estos reportes.

Dentro de los puntos débiles en el proceso de experimentación, se tiene en cuenta que el medio líquido PreservCyt® presentaba limitación de conservación de la mues-

tra de ocho semanas, lo que pudo interferir con el ensayo realizado por RLB, dado que aun cuando las muestras fueran positivas para el control de calidad de la prueba (β -Globina), las señales resultaban variantes entre fuertes y débiles; además fue necesario excluir varias muestras β -Globina negativa, unido al hecho de que el tamaño muestral no resultaba tan amplio.

Teniendo en cuenta que 61 muestras no fueron adecuadas, posiblemente por factores inherentes al manejo de éstas, los resultados se muestran como el análisis de una serie de casos donde se identificaron subtipos virales específicos. La frecuencia global de VPH encontrada fue significativamente menor a la reportada en el estudio original, donde se obtuvieron las muestras cervicales (57,6%) (12). Lo anterior debido posiblemente, a que las muestras fueron colectadas y a continuación procesadas con el sistema Amplicor[®], mientras que la técnica Reverse Line Blot se desarrolló en la mayoría de los casos, en intervalos posteriores. Esto permite concluir que el ADN de algunas muestras pudo haberse deteriorado parcial o totalmente. En Colombia, un estudio de Soto y colaboradores encontraron una frecuencia de VPH de 49,2% (13), mayor a la encontrada en este estudio. Otro trabajo realizado por Molano y colaboradores en el 2002 (14), encontraron una prevalencia de VPH en mujeres con diagnóstico citológico normal de 15%, un poco menor al encontrado en este estudio para pacientes con diagnóstico histopatológico negativo. Sin embargo, en pacientes con diagnóstico citológico de LSIL en este mismo estudio de Molano y colaboradores, hallaron una prevalencia de VPH de 55,7%, mayor a la encontrada en nuestro estudio para lesiones de bajo grado en diagnóstico histopatológico.

Algunas publicaciones sugieren que la prevalencia de la infección por VPH disminuye con la edad (16, 17). Los resultados logrados en esta investigación se detectaron mayor prevalencia en mujeres jóvenes dentro del grupo de las mujeres menores de 25 años. En otra cohorte realizada en Taiwán (18), se observaron dos picos de mayor prevalencia; uno en mujeres menores de 25 años y otro en mujeres mayores de 65 años.

En referencia a la implementación de la técnica del Reverse Line Blot en nuestro laboratorio, consideramos que logramos cumplir dicho objetivo, con el fin de genotipificar las muestras incluidas en el estudio. Dicha técnica se desarrolló según lo descrito por Van den Brule en el 2002 (5). En total se identificaron 26 genotipos, el tipo más frecuente fue VPH 16, tal como se observa en otras investigaciones (19, 20). La identificación específica del genotipo viral presente y causante de la infección cervical, es ampliamente sugerido por la IARC Working Group 2005 (21), para el manejo de las pacientes con anormalidad en su citología; puesto que conocer genotípicamente el comportamiento de nuestra población, permite el desarrollo de vacunas eficientes para los programas de prevención y un manejo oportuno de estas pacientes. Por ejemplo,

el segundo tipo más prevalente encontrado aquí es el VPH 52, cuando en otros lugares es el VPH 18 el que ocupa un segundo lugar (1, 8, 9, 10), y en otros estudios realizados para la población Argentina y en Mozambique el segundo y primer tipo viral más común es VPH 35 (22, 23), respectivamente; demostrando así una evidente variabilidad demográfica y geográfica.

En referencia a las infecciones simples, Molano y colaboradores en el 2003 (15) encontraron un 51% un poco menor a la encontrada en este estudio. Con respecto a las infecciones múltiples, Soto y colaboradores encontraron una mayor frecuencia (59,8%), y Molano y colaboradores en el 2003 (15) hallaron una prevalencia menor (20%) con respecto a la encontrada en este estudio, pero similar a la prevalencia reportada en el estudio de Guanacaste (10), donde el 39% de las infecciones involucraban múltiples tipos de VPH cuando se analizaron mujeres con diagnóstico de citología normal. Esto evidencia que la presencia de múltiples tipos virales en un individuo es común; aunque en otras investigaciones como el estudio ALTS Group (24), el porcentaje (56%) de múltiple infección fue mayor que el de infección única. La variabilidad de estos porcentajes podría estar determinada por razones metodológicas y características de la población estudiada, llamando la atención que, por lo general, en las mujeres jóvenes es más frecuente la múltiple infección (24, 25), pero los resultados generados en este trabajo no son concordantes con esa tendencia. En el presente estudio, todas las mujeres con infección múltiple (excepto una), tenían al menos un tipo viral de alto riesgo, siendo los tipos más frecuentes VPH 16, 52, 56, 66, 59, 31 y 35 como aparece en la tabla 4. Por último, un estudio reciente (25), concluye que las infecciones con múltiples tipos virales, se pueden asociar con una tasa incrementada de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y, así mismo, con una infección más severa y persistente por VPH.

A todas las participantes se les practicó colposcopia y a quienes presentaron hallazgos atípicos, se les realizó biopsia cervical. La clasificación del resultado se realizó de acuerdo con los criterios de la OMS y Bethesda; éstos se agruparon en negativo, bajo grado, alto grado/carcinoma *in situ*.

Es importante destacar que en cualquiera de las frecuencias obtenidas en estas categorías, se observó predominio de tipos virales de alto riesgo. Además, otro hecho importante, es que de las biopsias realizadas a las mujeres participantes en el estudio, tenían un reporte no involucrado con lesiones precursoras de cáncer cervical, pero una prevalencia del virus de 21,6%, la más alta encontrada dentro de los cuatro grupos analizados, incluso que la encontrada para lesiones de bajo grado.

Como conclusión, en el estudio fue necesario excluir un alto porcentaje de muestras, debido al tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento de la muestra;

sin embargo, de las 302 muestras analizadas, los tipos virales de alto riesgo estuvieron presentes y con mayor frecuencia vPH 16, 52, 56, 66, 59, 31 y 35, y los de bajo riesgo estuvieron presentes en el 17,8%.

AGRADECIMIENTOS

A todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio. A las directivas y funcionarios del Laboratorio de Patología y del Laboratorio Clínico, área Biología Molecular de la Clínica Colsanitas, S. A. A la Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia e Instituto de Biotecnología, por su financiación y facilitar todas sus instalaciones.

REFERENCIAS

1. A. Lang, I. Wikstrom, E. Wilander, Significance of HPV tests on women with cervical smears showing ASCUS, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **84**, 1001 (2005).
2. J.M.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosh, A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, C.J.L.M. Meijer, N. Muñoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world-wide, *J. Pathol.*, **189**, 12 (1999).
3. F. Bosch, N. Muñoz, The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, *J. Clin. Pathol.*, **55**, 244 (2002).
4. J.P.A. Baak, A.J. Kruse, S.J. Robboy, E.A.M. Janssen, B. van Diermen, I. Skaland, Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers, *J. Clin. Pathol.*, **59**, 1017 (2006).
5. A. van den Brule, L. Schouls, GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes, *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 779 (2002).
6. J. Sambroock, D.W. Rusell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
7. A.M. de Roda Husman, J.M. Walboomers, A.J. van den Brule, C.J. Meijer, P.J. Snijders, The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR, *J. Gen. Virol.*, **76**, 1057 (1995).

8. P.E. Castle, D. Solomon, M. Schiffman, C.M. Wheeler, Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities, *J. Nat. Cancer Inst.*, **97**, 1066 (2005).
9. C.E. Depuydt, A.J. Vereecken, G.M. Salembier, A.S. Vanbrabant, L.A. Boels, E. Herck, M. Arbyn, K. Segers, J.J. Bogers, Thin-layer liquid-based cervical cytology and PCR for detecting and typing human papillomavirus DNA in Flemish women, *Br. J. Cancer*, **88**, 560 (2003).
10. R. Herrero, A. Hildesheim, C. Bratti, M.E. Sherman, M. Hutchinson, J. Morales, I. Balmaceda, M.D. Greenberg, M. Alfaro, R.D. Burk, S. Wacholde, M. Plumme, M. Schiffman, Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica, *J. Nat. Cancer Inst.*, **92**, 464 (2000).
11. C. Dane, G. Batmaz, B. Dane, A. Cetin, Screening properties of human papillomavirus testing for predicting cervical intraepithelial neoplasia in atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion smears: a prospective study, *Ann. Diag. Pathol.*, **13**, 73 (2009).
12. M. Isaza, G. Pérez, O.L. Morales, R. Deantonio, L. Trujillo, Exactitud del test ADN-HPV para la detección de la enfermedad cervical de alto grado (NIC2+) en mujeres con anomalías citológicas (ASC-US y LSIL), afiliadas a la seguridad social en Bogotá (Colombia), *Rev. Colomb. Obstetr. Ginecol.*, **60**, 213 (2009).
13. M. Molano, H. Posso, E. Weiderpass, A.J.C. van den Brule, M. Ronderos, S. Franceschi, C.J.L.M. Meijer, A. Arslan, N. Munoz, Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology, *Br. J. Cancer*, **87**, 324 (2002).
14. S.C. Soto-De León, M. Camargo, R. Sanchez, S. León, M. Urquiza, J. Acosta, D. Monsalve, L.E. Rodríguez, M.E. Patarroyo, M.A. Patarroyo, Prevalence of infection with high-risk human papillomavirus in women in Colombia, *Clin. Microbiol. Infect.*, **15**, 100 (2009).
15. M. Molano, A.J.C. van den Brule, M. Plummer, E. Weiderpass, H. Posso, A.J.L.M. Arslan, C. Meijer, N. Muñoz, S. Franceschi, Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: A population-based, 5-year follow-up study, *Am. J. Epidemiol.*, **158**, 486 (2003).
16. M.V. Jacobs, J.M. Walboomers, P.J. Snijders, F.J. Voorhorst, R.H. Verheijen, N. Franssen-Daalmeijer, C.J. Meijer, Distribution of 37 mucosotropic HPV types in

- women with cytologically normal cervical smears: the age related patterns for high risk and low risk types, *Int. J. Cancer*, **87**, 221 (2000).
17. G.Y. Ho, R. Bierman, L. Beardsley, C.J. Chang, R.D. Burk, Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women, *New Engl. J. Med.*, **338**, 423 (1998).
 18. D.C. Ding, H.C.H. Hsu, R.L. Huang, H.C.H. Lai, C.H.Y. Lin, M.H. Yu, T.Y. Chu, Type-specific distribution of HPV along the full spectrum of cervical carcinogenesis in Taiwan: An indication of viral oncogenic potential, *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.*, **140**, 245 (2008).
 19. O. Forslund, B.G. Hansson, B. Bjerre, Typing of human papillomaviruses by consensus polymerase chain reaction and a non-radioactive reverse dot blot hybridization, *J. Virol. Methods*, **49**, 129 (1994).
 20. R. del Prete, A.M. Taranto, M.R. Lipsi, V. Nirchio, R. Antonetti, G. Miragliotta, Prevalence and genotypes identification of human papillomavirus infection in a population of South Italy, *J. Clin. Virol.*, **42**, 211 (2008).
 21. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Prevention Strategies, "Cervix Cancer Screening", vol. 10, Lyon, France, 2005.
 22. E. Matos, D. Loria, G.M. Amestoy, L. Herrera, M.A. Prince, J. Moreno, C. Krunfly, A.J. van den Brule, C.J. Meijer, N. Muñoz, R. Herrero, Prevalence of human papillomavirus (HPV) infection among women in Concordia, Argentina: A population-based study, *Sex. Transm. Dis.*, **30**, 593 (2003).
 23. X. Castellsagué, C. Menéndez, M.P. Loscertales, J.R. Kornegay, F. dos Santos, F.X. Gómez-Olivé, B. Lloveras, N. Abarca, N. Vaz, A. Barreto, F.X. Bosch, P. Alonso, Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique, *Lancet*, **358**, 1429 (2001).
 24. ALTS Group, Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: Baseline data from a randomized trial, *J. Nat. Cancer Inst.*, **92**, 397 (2000).
 25. C. Cuschieri, H.A. Cubie, The role of human papillomavirus testing in cervical screening, *J. Clin. Virol.*, **32**, 34 (2005).