

## **Diagnóstico del Virus Papiloma Humano en cuello uterino de mujeres que acuden a su consulta anual citológica**

Aldo Reigosa<sup>1,2</sup>; Maritza Alvarez<sup>3</sup>; Micaela De Vasconcelo<sup>1</sup>; Rosa Cristina<sup>1</sup>; Wendy Salas<sup>1</sup>, Vilma Rebolledo<sup>2</sup>, Alegría Voldman<sup>4</sup>

Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC)

<sup>1</sup>Departamento de Morfofisiopatología, Escuela de Bioanálisis, Universidad de Carabobo; <sup>2</sup>Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", Valencia. <sup>3</sup>Laboratorio Genomik C.A. Maracay. <sup>4</sup>Centro de Medicina Preventiva Municipal Brisas de Carabobo, Naguanagua, Valencia.

**Correspondencia:** Aldo Reigosa. Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", Bárbula. Valencia, Venezuela.

Fax: (0241) 8591432

Teléfono habitación: (0241) 8259178

Correo electrónico: [areigosa@postgrado.uc.edu.ve](mailto:areigosa@postgrado.uc.edu.ve)

*Trabajo financiado por CDCHT, Universidad de Carabobo.*

---

## **RESUMEN**

El presente estudio realizó la detección y tipificación del virus papiloma humano (VPH) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un grupo de 58 mujeres asintomáticas, las cuales acudieron a el Centro de Medicina Preventiva Brisas de Carabobo, de la ciudad de Valencia, entre febrero y marzo del año 2002. Se detectó a través de la PCR 34,5 % (20/58) de casos positivos, mientras que la citología identificó 18,2 % (8/44) de infección por VPH. Predominaron los genotipos de riesgo intermedio con 42,9 % (9/21), con respecto a los de bajo riesgo con 38,1 % (8/21) y los de alto riesgo con 19 % (4/21). Las cepas mas frecuentes fueron para el grupo intermedio la 45, mientras que para los grupos de bajo y alto riesgo fue la 6 y 16 respectivamente. Por otro lado, factores relacionados con la infección por VPH, como: edad, multiparidad, relaciones sexuales a temprana edad, hábito de fumar y promiscuidad no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). En conclusión, la PCR detectó mayor número de mujeres con VPH que la citología, el diagnóstico de la infección por VPH en mujeres asintomáticas presentó una alta frecuencia de cepas de riesgos intermedio y alto (61,9 %).

**Palabras clave:** VPH, PCR, cáncer de cuello uterino.

## ABSTRACT

### Diagnosis of human papillomavirus in uterine cervix of women undergoing annual cytologic checkup.

The present study carried out human papillomavirus (HPV) detection and genotyping by polymerase chain reaction (PCR) in a group of 58 asymptomatic women attending the Preventive Medicine Center *Brisas de Carabobo* in the city of Valencia, between February and March 2002. 34.5 % (20/58) positive cases were detected by PCR, while cytology identified 18.2 % (8/44). Intermediate risk genotypes prevailed, 42.9 % (9/21), over low risk, 38.1 % (8/21); and high risk, 19 % (4/21). The most frequent strain for the intermediate group was 45, while those for the low and high risk groups were 6 and 16, respectively. Other factors related to HPV infection such as age, multiparity, sexual relations at a young age, smoking habit and promiscuity were not statistically significant ( $p>0.05$ ). In conclusion, PCR detected more women with HPV than cytology. HPV diagnoses in asymptomatic women presented a high frequency of intermediate and high risk strains (61.9 %).

**Key words:** HPV, PCR, uterine cervix cancer.

---

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino se ubica entre la primera a tercera causa mundial de cáncer en mujeres, con cerca de 400.000 casos diagnosticados por año. En países subdesarrollados, representa un problema de salud pública por la alta morbilidad y mortalidad. En Venezuela, constituye el cáncer más frecuente en mujeres (1-4). El virus papiloma humano (VPH) ha surgido en los últimos 15 años como el factor etiológico más importante del cáncer cervical (5,6). Hasta el presente, se han reconocido más de 90 tipos de VPH, de los cuales 35 afectan las mucosas, que pueden agruparse de acuerdo al riesgo oncogénico en tipos de: alto (AR), intermedio (RI) o bajo riesgo (BR).

Estudios han demostrado que el VPH-AR está presente en más del 99,7 % de los carcinomas invasores cervicales (6-9). Además, estudios prospectivos de mujeres con citologías morfológicamente normales y anormales, han mostrado que la infección persistente con VPH-AR precede a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (lesión precursora del carcinoma cervical invasor, subclasificada de I a III, de acuerdo a su extensión en el epitelio) y que la infección persistente es necesaria para el desarrollo y progresión de estos NIC (6,8).

Cuando la mujer es sexualmente activa, aumenta el riesgo de infección con VPH-AR. En 80 % de las mujeres infectadas, la infección es transitoria, no se desarrolla NIC, y el virus desaparece en 6 a 8 meses. Una respuesta de anticuerpos neutralizadores contra el VPH-AR parece proteger a estas mujeres del desarrollo de NIC. En el otro 20 % de las mujeres infectadas con

VPH-AR, se desarrolla NIC; pero en la mayoría de éstas, el virus también desaparece y la lesión subsecuentemente también.

El desarrollo de una respuesta de células T citotóxicas contra el VPH es probablemente esencial en este proceso, lo cual es reflejo de un sistema inmune competente. Sin embargo, en un pequeño grupo de mujeres, el virus no desaparece, y la infección se hace persistente (6,7). Esto puede llevar al mantenimiento del NIC o progresión de NIC I a NIC III, y luego a carcinoma invasor. El tiempo de evolución de NIC I a carcinoma invasor es muy variable, depende del tipo de cepa infectante, la inmunidad del huésped y la carga viral, generalmente es de 10 a 20 años (3,10). La citología cérvico-vaginal sigue siendo el pilar de la detección precoz del cáncer cervical, pero modelos más recientes de carcinogénesis sugieren que la detección del ADN viral por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es más sensible que la citología (11,12).

El ADN viral es detectado en prácticamente todos los carcinomas cervicales, y la prevalencia aumentada de VPH se observa con el aumento de la severidad del NIC. Debido a esta asociación, se ha sugerido que la detección de cepas de VPH-AR pueda ser utilizada como herramienta en la identificación de mujeres con mayor riesgo para desarrollar cáncer cervical. En este contexto, se ha demostrado que las mujeres con cepas de VPH-AR, con frotis citológicos normales, presentan 116 veces más riesgo de desarrollar NIC III que las mujeres con citología normal sin VPH o con cepas de BR (13-16).

En este trabajo se estudió la frecuencia de la infección por VPH en pacientes asintomáticas y sin lesiones evidentes, así como cuales son las cepas más frecuentes y su asociación con la edad, número de parejas sexuales, paridad, hábitos tabáquicos y resultado de la citología.

## **MATERIALES Y METODOS**

Se seleccionaron 58 pacientes sucesivas que acudieron a la consulta de planificación familiar y control ginecológico del Centro de Medicina Preventiva Municipal Brisas de Carabobo de Naguanagua, Valencia, en el periodo comprendido entre febrero y marzo del año 2002. Las pacientes fueron asintomáticas y no presentaron lesiones sugestivas de infección por VPH al examen ginecológico, excluyéndose en el estudio una paciente cuyo estudio posterior reveló la presencia de algún tipo de NIC. La muestra para estudio citológico se tomó según la técnica habitual y coloreada según la técnica de Papanicolaou. La muestra para PCR se obtuvo mediante un raspado firme, pero sin producir sangrado, con hisopo estéril del exocérvis y endocérvis, éste se colocó en un vial y preservó a 4°C hasta su procesamiento.

Para evitar contaminación en la amplificación, la PCR se realizó en tres etapas: 1) preparación de la muestra, 2) ensamblaje de la reacción y 3) visualización del producto. Por cada muestra, a un tubo de reacción con 45  $\mu$ L de la solución  $\alpha$ -globina se añadió 5  $\mu$ L de ADN extraído, colocándose en un

termociclador PTC-100 De M.J-Research, Inc. (para los cebadores S7/S8), con los siguientes ciclos: 4 minutos a 94°C donde se llevó a cabo el primer ciclo de desnaturalización, 30 segundos a 94 ° C para completar el ciclo de desnaturalización, 1 minuto a 55°C para el ciclo de hibridación de los cebadores en el ADN y 90 segundos a 72° C para la extensión, y 10 minutos a 72°C para la extensión final. En un gel de agarosa al 2 % preparado en solución 0,045 M Tris Borato, 0,001 M EDTA, pH 8,0 (TBE 1X) más bromuro de etidio 0,5 ì g/ml, se coloca una mezcla con 7 ì L del producto amplificado y 2 ì L de solución de carga, incluyendo 0,5 ì g de marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega), para correrlos en electroforesis de 120 voltios por 1 hora. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se consideraron positivos los que tuvieron una talla amplificada de 450 pb correspondiente al genoma del VPH. Se realizó una mezcla con 5 ì l de las muestras en las cuales se obtuvo ADN amplificable con  $\alpha$ -globina, más un tubo de reacción para cada una de ellas, se utilizaron los cebadores de la L1 dentro del ORF denominado MY09 y MY11, que amplificó una talla de 450 pares de base (pb) y se empleó como control positivo a la dilución de células Hela (entre 20 y 40 copias de VPH-18 por célula) y como control negativo ADN de células humana que no contiene el genoma de VPH.

La sensibilidad se estimó en 10 células Hela. Para la amplificación se utilizó una mezcla suministrada por el kit PVHFast. De las muestras amplificadas positivas para VPH se toman 27 ì L y se les añadió 2,5 ì L de la enzima 1 de restricción resuspendiendo varias veces; posteriormente se tomaron 15 ì L de esta mezcla y se agregó 1 ì L de la enzima 2 de restricción; se incubaron los tubos de Enzima 1 y Enzima 1 + Enzima 2 por 2 horas; posteriormente se añadió a cada tubo 3 ì l de solución de carga, colocándose esta mezcla en un gel de agarosa de alta resolución al 2,5 % en TBE 1X más bromuro de etidio a 0,5 ì g/mL. Se incluyó 0,5 ì g del marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder y se corrió por electroforesis a 80 voltios por 1 hora. La banda amplificada de ADN de VPH de 450 pb se digiere originando un patrón de banda en función del genotipo viral y se analiza de acuerdo al patrón de restricción suministrado por el fabricante de PVHfast (9,17-20).

Los resultados fueron analizados con porcentajes y la prueba del chi cuadrado para significancia estadística en el programa Statistic.

## RESULTADOS

En las 58 pacientes estudiadas se observó una media de 31,2 años con un rango de 15 a 54 años. La Tabla 1 muestra que por PCR se detectó 34,5 % (20/58) casos positivos, en comparación con la citología en donde resultaron positivas 18,2 % (8/44); con  $p = 0,034$ .

**Tabla 1** Comparación de la PCR y la citología en el diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en cuello uterino

|           | PCR |      | CITOLOGIA |      |
|-----------|-----|------|-----------|------|
| RESULTADO | n   | %    | N         | %    |
| POSITIVO  | 20  | 34,5 | 8         | 18,2 |
| NEGATIVO  | 38  | 65,5 | 36        | 81,8 |
| TOTAL     | 58  |      | 44        |      |

Las cepas con mayor frecuencia fueron la 6 y 16, representando cada una 19 %, seguidas por la 11 y 45 con 14,3 % (Tabla 2). Se observó una infección múltiple, por las cepas 16 y 55.

**Tabla. 2 Distribución de la frecuencia de las cepas de VPH tipificadas por PCR**

| CEPA / RIESGO ONCOGENICO | n  | %    |
|--------------------------|----|------|
| 6 (BR)*                  | 4  | 19   |
| 11 (BR)*                 | 3  | 14,3 |
| 16 (AR)*                 | 4  | 19   |
| 31 (RI)*                 | 1  | 4,8  |
| 33 (RI)*                 | 2  | 9,3  |
| 45 (RI)*                 | 3  | 14,3 |
| 53 (RI)*                 | 2  | 9,5  |
| 55 (BR)*                 | 1  | 4,8  |
| 69 (RI)*                 | 1  | 4,8  |
| Total                    | 21 |      |

\*BR = bajo riesgo, RI = riesgo intermedio, AR = alto riesgo.

En relación al riesgo oncogénico, las cepas BR representaron el 28,6 %, mientras que las de RI 52,38 % y las de AR 19,05 %. La relación del riesgo oncogénico del VPH con la edad de las pacientes se presenta en la Tabla 3. Destaca que el 75 % de los casos con cepa de AR ocurrieron en pacientes entre 15 y 24 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

**Tabla 3 Distribución de frecuencia de las cepas del VPH tipificadas por pcr segun la edad y el riesgo oncogénico**

| EDAD  | CEPAS VPH |      |    |      |    |    |       |      |
|-------|-----------|------|----|------|----|----|-------|------|
|       | BR        |      | RI |      | AR |    | TOTAL |      |
|       | n         | %    | n  | %    | n  | %  | n     | %    |
| 15-24 | 2         | 25   | 3  | 33,3 | 3  | 75 | 8     | 38,1 |
| 25-34 | 2         | 25   | 2  | 22,2 | 0  | 0  | 4     | 19   |
| 35-44 | 3         | 37,5 | 4  | 44,5 | 1  | 25 | 8     | 38,1 |
| 45-54 | 1         | 12,5 | 0  | 0    | 0  | 0  | 1     | 4,8  |
| TOTAL | 8         | 38,1 | 9  | 42,9 | 4  | 19 | 21    |      |

Respecto a la paridad, las pacientes con tres o más paras, resultaron positivas en el 42,86 % (9/21) en comparación con las nulíparas 38,46 % (5/13). Las infectadas fumadoras representaron 27,78 % (5/18), mientras que las infectadas no fumadoras 37,5 % (15/40). Al observar la relación de la infección por VPH con el número de parejas sexuales, aquellas con 2 parejas presentaron la infección en 50 % (9/18) de los casos, mientras que aquellas con 1 pareja el 26,67 % (8/30).

La frecuencia de VPH relacionada a la edad de inicio de las relaciones sexuales, revela que la infección predominó entre las mujeres que iniciaron relaciones entre los 13 a 19 años con 41,67 % (15/36), mientras que las que iniciaron después de 20 años, 25 % (5/22) presentó la infección. Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ).

## DISCUSIÓN

El cáncer de cuello uterino y sus precursores está relacionado en 99,75 % de los casos al VPH; su evolución natural dependerá de la cepa, la carga viral y la inmunidad del huésped (15,21).

Los programas de pesquisa para diagnosticar la neoplasia intraepitelial cervical están basados en la citología, la cual es una prueba morfológica importante en la detección de las manifestaciones del VPH (22,23). La citología presenta la desventaja de no poder identificar la infección del VPH en su fase latente, así como tampoco la cepa, a diferencia de la PCR que lo detecta y tipifica en cualquier estadio (24).

En el presente trabajo, la detección de muestras positivas para VPH en las citologías normales al realizar la PCR fue de 34,5 %; cifra menor al estudio realizado por Jacobs (25), el cual encontró en una población de mujeres con citología normal, 78 % infectadas. Las pocas fallas del PCR pueden deberse al almacenamiento del producto amplificado, ya que al congelar y descongelar la muestra, puede romperse el ADN (26).

La PCR, resultó mejor técnica en la detección del VPH que la citología, con un valor de  $p = 0,034$ , similar a los resultados obtenidos por Resnick y colaboradores (17). Sólo se encontró un trabajo, realizado por Schiffman (2), el cual no se correlacionó con este estudio, en él se reporta mayor frecuencia de las cepas de AR con un 41,3 %, seguido de las de RI con 30,5 %. En este sentido, es importante considerar que las cepas de RI también son halladas en los carcinomas invasores, al igual que las de AR, aunque en menor proporción; mientras que las de BR se detectan en lesiones benignas (17).

Diversos estudios han demostrado la relación del cáncer cervical con la infección persistente de VPH-AR, la cual precede a un NIC, y a la progresión de éste a un carcinoma invasor (27,28). En este estudio, el único representante de las cepas de AR fue el tipo 16. La cepa 16 es una de las más comunes en el desarrollo de malignidad, siendo responsable en 50 % de los casos; después se encuentran las cepas 18, 31 y 45 (29-31).

En la totalidad de las muestras en estudio no se encontró la cepa 18, pero sí la 31, catalogada como de RI (9). Las cepas de AR se detectaron en menor porcentaje, pero más frecuente en las mujeres de 15 a 24 años. El trabajo de Jacobs (25), encontró más diagnósticos de cepas de AR en el grupo de 30 a 44 años y de 45 a 60 años con un 77,4 %; similar al trabajo de Sellors (32), el cual halló significancia entre la frecuencia de las cepas de AR y las edades mayores de 45 años, mientras que en este trabajo, en ese mismo grupo etario, sólo el 25 % de los casos presentaron cepas de AR.

En cuanto a la edad, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Burk (33) encontró significancia estadística ( $p < 0,02$ ) de la infección con el grupo de mujeres de 21 a 23 años. Kjaer (34), menciona que la presencia del VPH puede disminuir con el paso de los años.

La relación del VPH con el número de parejas sexuales, se ha considerado como el principal factor de riesgo para desarrollar atipia celular y producir NIC (1,2,5,33). En este estudio no se encontró relación estadística ( $p = 0,071$ ) entre estas variables; tal vez por el tamaño de muestra estudiada. Sellors (32) y Moscicki (35) no encontraron significación estadística entre estas dos variables. Las mujeres que han tenido varias parejas sexuales o cuyas parejas lo han hecho, poseen mayor riesgo de adquirir VPH, ya que éste se transmite principalmente a través de las relaciones sexuales (33). La frecuencia del VPH en mujeres con una sola pareja sexual fue alta, siendo probable que esto se relacione con la pareja masculina.

Existen mecanismos que pueden explicar la relación del hábito de fumar con el cáncer de cuello uterino, especialmente por la presencia de metabolitos en el moco cervical (36). Además, el cigarrillo ejerce un poder perjudicial en la respuesta inmunológica, al interferir en sus funciones, favoreciendo el alojamiento de los virus en el cuerpo (36,37). El hábito de fumar puede ser un cofactor al desarrollo del cáncer cervical. En este estudio no se encontró relación estadística ( $p = 0.47$ ) entre el VPH y el cigarrillo. Mientras que Sellors (33), reporta estrecha relación entre estas dos variables.

El mecanismo de asociación entre el número de partos y el VPH no se conoce. Se cree que el número de partos y las cesáreas no aumentan el riesgo, sino más bien la influencia de las hormonas, nutrición y modulación de las respuestas inmunitarias durante el embarazo (38,39). Al relacionar la multiparidad al VPH, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,63$ ). El trabajo de Sellors (32) concuerda con éste, ya que no encontró ninguna significancia entre las variables, pero coincide con Schiffman (2).

La asociación del VPH con el inicio de las relaciones sexuales a temprana edad no fue significativa. Varios trabajos concluyen que la asociación del virus con el inicio de relaciones sexuales a temprana edad, se debe exclusivamente a los cambios de parejas sexuales que se tengan durante esa época (2,33).

Se puede concluir que el diagnóstico de la infección por VPH en mujeres asintomáticas fue alto, con predominio de cepas de RI y AR, aun cuando los datos no son representativos de la población, constituyen un marco de referencia para futuros trabajos y contribuye al conocimiento de la situación en nuestro medio.

## REFERENCIAS

1. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz AT, Burk RD, Morales J, Rodríguez AC, Helgesen K, Alfaro M, Hutchinson M, Balmaceda I, Greenberg M, Schiffman M. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001; 84:1219-1226.
2. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Walcholder S, Alfaro M, Hutchinson M, Morales J, Greenberg MD, Lorincz AT. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in high-risk province of Costa Rica. *JAMA*. 2000; 283:87-93.
3. Garcia M, Reeves W, Brinton L. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latinoamerica. *N Engl J Med*. 1993; 320:1437-1441.
4. Chichareon S, Herrero R, Muñoz N, Bosch FX, Jacobs MV, Deacon J, Santamaria M, Chongsuvivatwong V, Meijer CJ, Walboomers JM. Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:50-57.
5. Koss LG. Cervical (Pap) smear. New directions. *Cancer*. 1993; 71(Suppl):1406-1412.
6. Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994; 186:131-156.
7. Tjound P, Hisaya F, Thomas W. Molecular biology of cancer and its precursors. *Cancer Rev*. 1995; 76:1902-1913.
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189:12-19.

9. Alvarez M, Chiarello A, Espinal E, Reigosa A, Marrero M. Detección del virus papiloma humano (VPH) en grupo de pacientes con sospecha clínica y/o anatomopatológica de infección por VPH. *Salus*. 2000; 4:19-26.
10. Kurman, R. (2002). *Blaustein's pathology of the female genital tract*. Springer, New York, 253-290.
11. Roman A, Fife KH. Human papillomavirus: Are we ready to type? *Clin Microbiol Rev*. 1989; 2: 166-190.
12. Miller AB. Failures of cervical cancer screening. *Am J Public Health*. 1995; 85:761-762.
13. De Villiers EM. Hybridization methods other than PCR: an update. In Munoz, N, Bosch F, Shah K, Meheus A. *The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*. IARC Sci Publ. 1992; 111-119.
14. Rozendaal L, Walboomers JM, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJ, van Ballegooijen M, Meijer CJ. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer*. 1996; 68:766-769.
15. Meijer CJ, van den Brule AJ, Snijders PJ, Helmerhorst T, Kenemans P, Walboomers JM. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the polymerase chain reaction in relation to cytology: possible implications for cervical cancer screening. *IARC Sci Publ*. 1992; 119: 271-281.
16. Jenkins D, Sherlaw-Johnson C, Gallivans S. Can papilloma virus testing be used to improve cervical cancer screening?. *Int J Cancer*. 1996; 65:768-773.
17. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, terSchegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82:1477-1484.
18. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239:487-491.
19. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV 16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2001; 10:46-54.
20. Hagmar B, Kalantari M, Skyldberg B, Moberger B, Johansson B, Walaas L, Warleby B. Human papillomavirus in cell samples from Stockholm Gynecologic Health Screening. *Acta Cytol*. 1995; 39:741-745.
21. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Gallaway DA, Vernon D, Kiviat NB. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation with papillomavirus infection. *N Engl J Med*. 1992; 327:1272-1278.
22. Miller AB, Anderson G, Brisson J, Laidlaw J, Le Pitre N, Malcolmson P, Mirwaldt P, Stuart G, Sullivan W. Report of national workshop on screening for cancer of the cervix. *CMAJ*. 1991; 145:1301-1325.
23. Schneider A, Zahm DM, Kirchmary R, Schneider VL. Screening for cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: validity of cytologic study, cervicography, and human papillomavirus detection. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 174:1534-1541.
24. Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*. 1990; 71:173-181.
25. Jacobs MV, Zielinski D, Meijer CJ, Voorhorst FJ, de Schipper FA, Runsink AP, Snejders PJ, Walboomers JM. A simplified and reliable HPV testing of archival Papanicolaou-stained cervical smears: application to cervical smears from cancer patients starting with cytological normal smears. *Br J Cancer*. 2000; 82:1421-1426.
26. Lorincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1996; 23:707-730.
27. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:1365-1371.
28. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ. Relation of human papillomavirus

- status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999; 354:20-25.
29. 29.- Galloway DA. Human papillomavirus vaccines: a warty problem. *Infect Agents Dis*. 1994; 3:187-193.
  30. 30- Tidy JA, Vousden KH, Farrell PJ. Relation between infection with a subtype of HPV 16 and cervical neoplasia. *Lancet*. 1989; 1:1225-1227.
  31. Stone KM. Epidemiological aspects of genital HPV infection. *Clin Obstet Gynecol*. 1989; 32:112-116.
  32. Sellors JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, Lorincz A, Dalby DM, Janjusevic V, Keller JL. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. *CMAJ*. 2000; 163:503-508.
  33. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis*. 1996; 174:679-689.
  34. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, Walboomers JM, Meijer CJ. Human papillomavirus--the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 1996; 65:601-606.
  35. Moscicki AB, Palefsky J, Smith G, Siboshski S, Schoolnik G. Variability of human papillomavirus DNA testing in a longitudinal cohort of young women. *Obstet Gynecol*. 1993; 82:578-585.
  36. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:868-873.
  37. Johnson JD, Houchens DP, Kluwe WM, Craig DK, Fisher GL. Effects of mainstream and environmental tobacco smoke on the immune system in animals and humans: a review. *Crit Rev Toxicol*. 1990; 20:369-395.
  38. Fife KH, Katz BP, Brizendine EJ, Brown DR. Cervical human papillomavirus deoxyribonucleic acid persists throughout pregnancy and decreases in the postpartum period. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 180:1110-1114.
  39. Smith EM, Johnson SR, Jiang D, Zaleski S, Lynch CF, Brundage S, Anderson RD, Turek LP. The association between pregnancy and human papilloma virus prevalence. *Cancer Detect Prev*. 1991; 15:397-402.