

Investigación del ADN del virus del papiloma humano en el cuello uterino en población rural del Perú

Concha-M Rosmelia,¹ Árias-Stella Javier Jr.,² Quiñones Diego,³ Bazán Máximo,⁴ Iwasaki Ricardo,⁵ Árias-Stella Javier⁶

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo investigar la prevalencia del virus del papiloma humano (VPH) en 384 mujeres (entre los 20 y 64 años de edad) procedentes de las seis regiones del Perú consideradas con el más alto porcentaje de población rural según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Los lugares de toma de las muestras fueron los establecimientos de Salud Regionales de Huancavelica, Cajamarca, Huánuco, Chachapoyas, Abancay y Juliaca. El tamaño de muestra se determinó usando la siguiente fórmula estadística: $n = Z12 \times p \times q/d2$; $n = 384.16$.

La recolección de las muestras cervicouterinas fue realizada por médicos ginecólogos mediante un cepillo que se suspendió en un frasco de base líquida para el examen citológico, captura de híbridos y PCR/RLB respectivos. Todos los casos positivos para VPH fueron sometidos a colposcopia y biopsia dirigida para el estudio histológico.

Se practicó la prueba de captura de híbridos usando el sistema de detección "Digene/hybrid capture two (HC²)", Digene MD y el PCR/RLB utilizando el Kit "Pure link Genomic ADN" de Invitrogen para determinar si la infección era causada por uno o varios tipos de VPH. Los estudios citológicos se interpretaron siguiendo el Sistema de Bethesda.

Los resultados mostraron que 6.77% de las mujeres mostraron anomalías en los estudios en base líquida (ASCUS, AGUS, LEIBG y LEIAG) y 4.4% mostraron algún tipo de lesión de acuerdo con los estudios histológicos (LEIBG, LEIAG, adenocarcinoma o carcinoma epidermoide). En conclusión hemos encontrado que hubo ADN de VPH en todas las lesiones detectadas; el más común fue el VPH tipo 16 que se encontró en 6 mujeres con algún tipo de lesión (8.22%), seguido por la coinfección (VPH 16 y VPH 31) en cuatro mujeres (5.48%).

Palabras clave: ADN, VPH, cáncer cervical.

ABSTRACT

This study aims to determine the prevalence of HPV and cervical intraepithelial lesions in 384 women—between the ages of 20 and 64—from the six regions with the highest percentage of rural inhabitants in Peru according to the National Institute of Statistics and Data Processing (INEI). These regions were Huancavelica, Cajamarca, Huanuco, Amazonas, Apurimac and Puno. The sample size was determined using the following statistical formula: $n = Z12 \times p \times q/d2$; $n = 384.16$.

The cytological diagnosis was based on samples suspended in a liquid preparation which were categorized according to the Bethesda Classification System. A Hybrid Capture 2 (HC²) assay and a PCR GP5/GP6 assay were performed to amplify part of the genomes of several HPV types to determine if the infection was caused by one of more HPV types. The results show that 6.77 % of the women had abnormalities detected in the liquid based cytological studies (ASCUS, LGSIL, HGSIL and AGUS) and 4.4 % of the women had some type of lesion according to the histological analysis (LGSIL, HGSIL, adenocarcinoma or epidermoid carcinoma). In conclusion, we found out that there was HPV DNA in all of the detected lesions, the most common being HPV type 16, which was found in 6 (8.22 %) participants with some type of lesion, followed by a co-infection (HPV 16 and 31) in 4 of the participants (5.48 %).

Key words: DNA, HPV, cervical cancer.

¹ Bióloga. Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.
² Patólogo. Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

³ Biólogo. Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

⁴ Técnico. Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

⁵ Biólogo. Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

⁶ Patólogo. Profesor Emérito de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

Correspondencia: Concha-M Rosmelia. Av. Gregorio Escobedo 612, Lima 11, Perú. 511-4601818. Correo electrónico: romelia_cm@yahoo.es

Este artículo debe citarse como: Concha-M R, Árias -Stella J Jr., Quiñones D, Bazán M, Iwasaki R, Árias-Stella J. Investigación del ADN del virus del papiloma humano en el cuello uterino en población rural del Perú. Patología Rev Latinoam 2012;50(4):266-271.

El análisis estadístico realizado por la *World Health Organization* ha señalado que el cáncer cervical es la segunda causa más común en el mundo de cáncer en la mujer.¹ Se ha estimado que cada año se diagnostican aproximadamente 493 000 nuevos casos y se producen 274 000 muertes por esta forma de cáncer en el mundo.^{1,2}

Ya hace algún tiempo que se identificó al virus del papiloma humano (VPH) como un factor tumorigeno en humanos. Más recientemente se ha demostrado que la infección con el VPH constituye el mayor riesgo para el desarrollo del carcinoma del cérvix y de sus precursores.³

De los más de 100 genotipos de VPH que se han aislado son los llamados del tipo “alto riesgo” los que están específicamente involucrados en el cáncer de cérvix. Entre estos se ha demostrado que más de 40 tienen capacidad de infectar el tracto genital y en 15 de ellos (genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) se ha encontrado asociación con el cáncer cervical o con las “neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado”. Por el contrario el VPH de otros genotipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) se han clasificado como tipos de “bajo riesgo”. Otros tres tipos adicionales (53, 26 y 66) se han clasificado como de “probable alto riesgo”, mientras que aquellos previamente no detectados permanecen como “indeterminados”.^{4,5} Conviene tener presente que el ADN de los tipos de VPH 16, 18 y 31 se ha aislado en entre 80 y 100% de los carcinomas del cérvix.⁶

Frente a este panorama es natural que nos preguntemos cuál es la situación en el Perú. De acuerdo con las estadísticas publicadas por el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana durante el periodo 1994-1997, ocurrieron 2 751 nuevos casos de cáncer de cuello uterino, lo que da una incidencia y una tasa de mortalidad de 23.5 y 10.94, respectivamente (tasa estandarizada por edad por 100 000).⁷

Es poca, sin embargo, la información que hasta ahora tenemos del grado de infección por el virus del papiloma humano en nuestro medio. En 1993 Guerrero-Alva⁸ estudió la prevalencia de la infección, en mujeres asintomáticas en un área marginal de Lima, utilizando células tomadas del canal cervical y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); encontró una prevalencia de la infección de 20.17%. En 2001 Almonte y sus colaboradores realizaron un tamizado utilizando diferentes técnicas (incluyendo la “captura de híbridos”) en el departamento de San Martín;

estudiaron a 5 435 mujeres entre los 25 y los 49 años de edad y reportaron una prevalencia de VPH de 12.6%.⁹ En 2007 Li Ning, Bazán y Árias-Stella Jr. presentaron, en la reunión de la Academia de Patología de Estados Unidos y Canadá, los primeros resultados sobre sus observaciones de la incidencia de infección por VPH; utilizaron el método de detección aprobado por la *Food and Drugs Administration* “PVH detection kit of Digene/hybrid capture two (HC2)” manufacturado por Digene (MD). Esta prueba mezcla probadores ARN genotipo-específico de “alto” y de “bajo riesgo”; los híbridos ARN-ADN se reconocen por medio de un anticuerpo usado para la fase de captura y como señal de amplificación del método. Estudiaron 2 596 pacientes de 17 a 87 años de edad procedentes de zonas urbanas. Reportaron VPH de “bajo riesgo” en 16.3% y de “alto riesgo” en 33.6%.¹⁰

En el presente trabajo hemos investigado la prevalencia de la infección con VPH en comunidades rurales del Perú utilizando las técnicas de PCR/RLB y la captura de híbridos. Además, se estudió la prevalencia de lesiones citológicas e histológicas, en esas pacientes, para intentar correlacionarlas con los resultados de la detección de VPH.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el periodo comprendido entre junio y diciembre de 2010 se estudiaron 384 mujeres, de entre 20 y 64 años de edad, procedentes de las seis regiones consideradas con el porcentaje más alto de población rural en el Perú según el INEI: Huancavelica, Cajamarca, Huánuco, Amazonas, Apurímac y Puno. Para este estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Ética para la Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres y del Comité Institucional de Ética en Investigaciones del Instituto Nacional de Salud del Perú. Se utilizaron, para la toma de las muestras, los establecimientos de salud regionales de los departamentos: Hospital Departamental de Huancavelica, Hospital Regional de Cajamarca, Hospital Regional Hermilio Valdizan de Huánuco, Hospital Regional Virgen de Fátima de Chachapoyas, Hospital Guillermo Díaz de la Vega de Abancay y el Hospital Carlos Monge Medrano de Juliaca. La deducción del tamaño de muestra se estableció a través de la siguiente fórmula estadística: $n = Z^2 \cdot p / d^2$; $n = 384$.¹⁶ El Cuadro 1 muestra la distribución de los casos estudiados.

Cuadro 1. Distribución de los casos estudiados

<i>Establecimiento de salud</i>	<i>Población</i>	<i>%</i>	<i>Muestras</i>
Hospital Departamental de Huan-cavelica	122 795	9,1	35
Hospital Regional de Cajamarca	406 628	30,1	116
Hospital Regional H: Valdezán M. de Huánuco	217 995	16,1	62
Hospital Regional Virgen de Fátima de Chachapoyas	106 970	07,9	30
Hospital G. Díaz de la Vega de Abancay	111 152	8,2	31
Hospital Carlos Monge Medrano de Juliaca	386 240	28,6	110
TOTAL	1 351 780	100%	384

Recolección de muestras cervicales

Cada participante obtuvo previamente un formulario de acuerdo (consentimiento informado) en forma aleatoria y voluntaria. La recolección de la muestra cervicouterina la realizó un médico ginecólogo mediante un citocepillo (*cervexbrush*) que se suspendió en un frasco de base líquida (Liqui Prep. LGM InteARNtional, Inc., Melbourne, FL USA), para el examen citológico, captura de híbridos y PCR/RLB respectivos. Posteriormente, a quienes tuvieron ADN de VPH (de “alto” o “bajo riesgo”) se les realizó colposcopia y una biopsia dirigida para complementar con un estudio histológico. Todos los procedimientos de laboratorio como citología, histología, captura de híbridos y PCR/RLB se realizaron en el Instituto de Patología y Biología Molecular Árias Stella.

El diagnóstico citológico se realizó a partir de las muestras suspendidas en base líquida y que fueron interpretadas de acuerdo con el Sistema de Clasificación Bethesda: a) dentro de límites normales; b) células escamosas atípicas de significación indeterminada (ASCUS); c) lesión escamosa intraepitelial de “bajo grado” (LEIBG); d) lesión escamosa intraepitelial de “alto grado” (LEIAG); e) carcinoma escamoso o adenocarcinoma.¹¹

Prueba de captura híbrida 2 (HC2)

La prueba del HC2 se realizó utilizando el contenido de las muestras de base líquida.¹² La hibridación clásica, la detección y la calibración se realizaron siguiendo estrictamente el manual de instrucciones de la “HC2”. Se usaron probadores para VPH de “alto riesgo”, genotipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, y de

“bajo riesgo”, genotipos: 6, 11, 42, 43 y 44. El resultado fue expresado como positivo o negativo dependiendo de la unidad relativa de luz de 1 pg/ml del ADN del VPH.

PCR/RLB

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit “Purelink Genomic ADN” de Invitrogen y siguiendo las instrucciones de su manual.¹³ Se realizó la prueba PCR GP5/GP6 para amplificar parte del genoma de distintos tipos de VPH, de forma independiente o en conjunto (coinfeción). Una vez obtenido el producto amplificado se procede a la hibridación reversa (RLB)¹⁴ que se basa en el uso de un “miniblotter” para detectar, en forma simultánea, hasta 37 sondas que contienen un grupo amino 5’ y han sido previamente “ancladas” a una membrana de nailon. Hasta 43 productos de PCR pueden ser pipeteados en los canales paralelos del “miniblotter”, de tal manera que sean perpendiculares a las filas de las sondas que fueron anteriormente depositadas y puedan hibridar si son complementarias. Luego se procede a incubar con estreptavidina y posteriormente la detección se realiza mediante quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence o ECL*).

En suma, en todos los casos investigados se realizaron estudios citológicos, captura de híbridos de “alto riesgo” y “bajo riesgo” y, los casos positivos para VPH, fueron sometidos a la tipificación específica del virus a través del procedimiento de hibridación reversa (RLB).

RESULTADOS

En cuanto a las características epidemiológicas el promedio de edad de las pacientes estudiadas fue de 42 años (rango de edad de 20 a 64 años). Fueron pacientes entre 30 y 49 años de edad 55.46%. Las mujeres de estado civil casada y conviviente constituyeron 54.4 y 26.3%, respectivamente. Las participantes con grado de instrucción superior constituyeron 53.1%.

En lo que se refiere a los antecedentes ginecológicos las participantes proporcionaron los siguientes datos: edad promedio de inicio de actividad sexual: 19 años (rango de 16 a 20 años): 52.86%. En cuanto al número de parejas sexuales refirieron: una pareja: 54.7% y dos a cuatro parejas: 44%. Señaló haber presentado antecedentes de infecciones de transmisión sexual: 20.6%. Uso de anticonceptivos orales: 49.2%. Otros antecedentes se observan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Antecedentes ginecológicos de las participantes

Antecedente	Número	Porcentaje
Edad de la primera relación sexual:		
10 a 15	55	14.32%
16 a 20	203	52.86%
21 a 25	91	23.70%
26 a 30	30	7.81%
Más de 30	5	1.30%
Total	384	100%
Número de parejas sexuales		
1	210	54.70%
2 a 4	169	44%
Más de 5	5	1.3%
No refiere	0	0
Total	384	100%
Número de Embarazos		
0	26	6.80%
1 a 2	148	38.50%
Más de 3	210	54.70%
Total	384	100%
ITS (infecciones de transmisión sexual)	79	20.60%
Anticonceptivos orales	189	49.20%
Fuma	31	8.10%
Antecedentes de citología anormal	29	7.60%

En lo que se refiere a los resultados, en los estudios citológicos en base líquida 6.77% mostraron alguna forma de anormalidad (ASCUS, LEIBG, LEIAG y AGUS) y en el diagnóstico histológico 4.4% presentaron alguna lesión (LEIBG, LEIAG, adenocarcinoma o carcinoma epidermoide) (Cuadro 3).

La investigación por captura de híbridos mostró 49 participantes (12.8%) con VPH de “alto riesgo”, 8 (2.1%) con VPH de “bajo riesgo” y 14 (3.5%) con infección por VPH de “alto y bajo riesgo”. De esta manera 71 mujeres (18.5%) de las 384 muestreadas presenta un resultado de captura de híbridos positiva para VPH (Cuadro 4).

Cuadro 3. Resultados de los estudios

BIOPSIA PAP	Negativo	LEIBG	LEIAG	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide	Nº	Total %
Normal	352	4	2	0	0	358	93.2%
ASCUS	14	3	0	0	0	17	4.4%
LEIBG	1	4	0	0	0	5	1.3%
LEIAG	0	0	2	0	1	3	0.8%
LEIAG + AGUS	0	0	0	1	0	1	0.3%
TOTAL	367	11	4	1	1	384	100%

Cuadro 4. Resultados de captura de híbridos

Resultado CH ²	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	313	81.50%
Alto Riesgo	49	12.80%
Bajo Riesgo	8	2.10%
Alto y Bajo Riesgo	14	3.50%
Total infectadas	71	18.50%
Total	384	100%

Al determinar los tipos de virus de papiloma humano (VPH) a través de la PCR/RLB encontramos que 73 mujeres (19.01%) resultaron positivas, de las cuales 51 (13.3%) presentaron un tipo de VPH, 21 (5.46%) dos tipos de VPH y finalmente, una participante presentó infección con tres tipos de VPH (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de la reacción en cadena de la polimerasa

Resultado PCR	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	311	80.99%
Positivo	73	19.01%
Con 01 tipo de VPH	51	
Con 02 tipos de VPH	21	
Con 03 tipos de VPH	01	
Total	384	100%

Independientemente del hecho de formar o no parte de una infección múltiple (por dos o tres tipos de VPH) los tipos de ADN de VPH más frecuentes fueron: VPH tipo 16 (en 43 mujeres), VPH tipo 18 (en 11 mujeres), VPH tipos 31 y 35 (en 7 mujeres), VPH tipo 6 (en 9 mujeres), VPH tipo 11 (en 5 mujeres), entre otros tipos que se detallan en el Cuadro 6.

Al determinar la prevalencia de lesiones (LEIBG, LEIAG, adenocarcinoma y carcinoma epidermoide) en los

Cuadro 6. Tipos de ADN de VPH encontrados

<i>VPH de alto riesgo</i>	<i>Frecuencia de presentación</i>	<i>Con VPH de bajo riesgo</i>	<i>Frecuencia de presentación</i>
VPH 16	43	VPH 6	9
VPH 18	11	VPH 11	5
VPH 31	7	VPH 42	2
VPH 33	4	VPH 43	2
VPH 35	7	VPH 81	2
VPH 45	1		
VPH 51	1		
VPH 66	1		
TOTAL	75	TOTAL	20

estudios citológicos e histológicos, para correlacionarlos con los resultados de la detección del ADN de VPH, encontramos que en todas las lesiones halladas existía ADN de VPH siendo más frecuente el VPH tipo 16 en 6 (8.22%) participantes con algún tipo de lesión seguido de una coinfección (VPH 16 y 31) en 4 de ellas (5.48%), Cuadro 7.

COMENTARIO Y CONCLUSIÓN

Para este estudio intentamos obtener una muestra representativa de la población rural del Perú. Con base en los datos del INEI la mayor población rural se ubica en Huancavelica (68.3%), Cajamarca (67.3%), Huánuco (57.5%), Amazonas (55.8%), Apurímac (54.1%) y Puno (50.3%); por ello tomamos como lugar de muestreo la capital o la ciudad con mayor población de cada región. Investigamos en total a 384 mujeres y encontramos una prevalencia de VPH por captura de híbridos de 18.5%; por PCR de 19%. Comparados con los resultados obtenidos por Almonte y sus colaboradores en 2007 nuestro estudio con captura de híbridos arrojó un resultado más alto que el obtenido en aquella oportunidad en la zona de la Amazonía. En cambio, nuestro estudio ha dado un resultado similar al obtenido por Guerrero-Alva en un muestreo de un grupo aislado de Lima metropolitana en la década de los 90 del siglo pasado.

Cuadro 7. Tipos de VPH en infecciones únicas o combinadas (continúa en la siguiente página)

<i>Tipos VPH</i>	<i>Sin lesiones</i>	<i>ASCUS</i>	<i>LEIBG</i>	<i>LEIAG</i>	<i>Adenocarcinoma</i>	<i>Carcinoma epidermoide</i>	<i>Con lesiones</i>	<i>TOTAL</i>
Infección con un solo tipo de VPH								52 (71.23%)
	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº(%)</i>	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº (%)</i>	<i>Nº (%)</i>
16	19 (26.03%)	3 (4.11%)	4 (5.48%)	2 (2.74%)	0	0	6 (8.22%)	28 (38.35%)
18	6 (8.22%)	0	0	0	0	0	0	6 (8.22%)
6	4 (5.48%)	0	1 (1.37%)	0	1 (1.37%)	0	2. (2.74%)	6 (8.22%)
11	2 (2.74%)	0	0	0	0	0	0	2 (2.74%)
31	1 (1.37%)	0	0	0	0	1 (1.37%)	1 (1.37%)	2 (2.74%)
33	1 (1.37%)	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	2 (2.74%)
35	4 (5.48%)	0	0	0	0	0	0	4 (5.48%)
45	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
81	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
Infección con múltiples tipos de VPH								21 (28.77%)
16 y 31	1 (1.37%)	0	3 (4.11%)	1 (1.37%)	0	0	4 (5.48%)	5 (6.85%)
16 y 35	1 (1.37%)	0	1 (1.37%)	1 (1.37%)	0	0	2 (2.74%)	3 (4.11%)
16 y 18	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
16 y 43		0	0	0	0	0	0	2 (2.74%)
16 y 81	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
16 y 66	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
16 y 51	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
18 y 11	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
18 y 42	0	0	1 (1.37%)	0	0	0	1 (1.37%)	1 (1.37%)

Cuadro 7. Tipos de VPH en infecciones únicas o combinadas (continuación)

Tipos VPH	Sin lesiones	ASCUS	LEIBG	LEIAG	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide	Con lesiones	TOTAL
6 y 11	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
6 y 18	0	0	1 (1.37%)	0	0	0	1 (1.37%)	1 (1.37%)
33 y 11	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
33 y 6	0	0	1 (1.37%)	0	0	0	1 (1.37%)	1 (1.37%)
16, 18 y 42	1 (1.37%)	0	0	0	0	0	0	1 (1.37%)
Total	51 (69.86%)	4 (5.48%)	12 (16.44%)	4 (5.48%)	1 (1.37%)	1 (1.37%)	18 (24.66%)	73 (100%)

Hemos demostrado que en la zona rural del Perú el VPH de “alto riesgo” es de mayor prevalencia que el de “bajo riesgo” y que el VPH 16 es el tipo de virus más frecuente en ese grupo. Entre los positivos de “bajo riesgo” el VPH más frecuente fue el del tipo 6. Nuestros resultados son armónicos con los obtenidos en otras latitudes.¹⁵

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a: Zulma Dávila Quiroga (obstetra) y Edy Medina (médico ginecólogo) del Hospital Guillermo Díaz de la Vega en Abancay. A Lino Elmer Rodríguez Julcamayan (médico ginecólogo) del Hospital Departamental de Huancavelica. A Silvana Camacho Alvarado (obstetra) y Nilton Ovidio Alvarado Calixto (médico ginecólogo) del Hospital Regional Hermilio Valdizan Medrano de Huánuco. A Luis Pinillos Vilca (médico ginecólogo) del Hospital Regional de Cajamarca. A Fidel Eduardo Perales Aliaga (médico ginecólogo) y Marleny Torres Zegarra (obstetra) del Hospital Regional Virgen de Fátima de Chachapoyas. A Javier Gerson Huanca Mamani (médico ginecólogo) y Evarista Melendrez Coaquira (obstetra) del Hospital Carlos Monge Medrano de Juliaca.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este artículo.

REFERENCIAS

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005;55:74-108.
- Bella MC, Schmidt-Grimminger D, Patrick S, Ryschon T, Linz L, Chauhan SC. High prevalence of human papillomavirus infection in American Indian women of the Northern Plains. *Gynecol Oncol.* 2007;107(2):236-241.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-265.
- Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N. Evaluation of Combined General Primer-Mediated PCR Sequencing and Type-Specific PCR Strategies for Determination of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cell Specimens. *J Clin Microb* 2007;45(3):928-34.
- Muñoz N, Bosch FX, De San Jose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med* 2003;348:518-527.
- Hopkins, J. Ginecología y Obstetricia. Marban, España. 2005, p. 451.
- Centro de Investigación en Cáncer “Maes-Heller”. Registro de Cáncer de Lima Metropolitana. 1994-1997. Diciembre, 2004; Volumen III.
- Guerrero-Alva I. Study of Prevalence of VPH Infection in Population Apparently Asymptomatic. *Acta Cancer Set* 1993;23(3):37-41.
- Almonte M, et.al. Cervical screening by visual inspection, VPH testing, liquid-based and conventional cytology in Amazonian Peru. *Int J Cancer* 2007;121:796-802.
- Li Ning ML, Bazan M, Arias-Stella Jr, J. USCAP 2008. United States & Canadian Academy of Pathology. March 1-7, 2008. Denver, CO. USA.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr., et. al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. 2002;287(16):2114-2119.
- Users Guide. Hybrid Capture 2 High-Risk VPH ADN Test. Digene VPH test. 2007, Digene Corporation. Gaithersburg, MD USA.
- User Manual. PureLink Genomic ADN Kits. For purification of genomic ADN. Version A. February 2007. INVITROGEN.
- Van Den Brule AJC, Pol R, Franssen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, Snijders P. GP5+/6+PCR followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes. *J Clin Microb* 2002;40(3):779-787.
- Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferre E, Bosch FX, De Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis* 2010;15;202(12):1789-99.