

ARTICULO ORIGINAL

**Detección molecular de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para el virus del papiloma humano de alto riesgo, período 2007-2011**

**Molecular detection of multiple infections in women with and without cervical lesion positive for high risk human papillomavirus, period 2007-2011**

**Cardozo Segovia FM, \*Mendoza Torres LP, Páez Acchiardi GM, Mongelós Dacunte PE, Castro Matto AM, Giménez Ortigoza G**

Departamento de Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigación de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay

**RESUMEN**

El cáncer de cuello uterino, causado por el virus del papiloma humano (HPV), constituye el tercer tipo de cáncer más común en mujeres en el mundo. El objetivo del presente trabajo fue determinar por reacción en cadena de la polimerasa seguida de hibridación reversa, la frecuencia de infecciones múltiples en mujeres positivas para HPV de alto riesgo oncogénico por captura híbrida II, según severidad de la lesión escamosa intraepitelial (SIL), carga viral relativa y edad, en el periodo 2007-2011. Este estudio de corte transversal incluyó 123 mujeres que acudieron al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 18 sin lesión (NSIL), 78 con SIL de bajo grado (LSIL) y 27 con SIL de alto grado (HSIL). Se detectaron infecciones múltiples en 37/123 mujeres (30,1%). Las mujeres con NSIL presentaron menor frecuencia de infecciones múltiples (5,6%) que las mujeres con SIL (34,3%) ( $p=0,03$ ). No se observó aumento de frecuencia de infecciones múltiples con la severidad de la lesión, presentando las mujeres con LSIL un 34,6% y con HSIL, un 33,3%. No fue observada diferencia significativa entre la carga viral relativa de infecciones simples y múltiples, lo cual sugiere que en la infección múltiple podría ser solo uno de los tipos de HPV el que se esté replicando, causando una infección productiva. Además, se observó una alta frecuencia de infecciones múltiples (75%) en mujeres menores a 30 años. Finalmente los resultados sugieren que las infecciones múltiples podrían orientar la presencia de SIL, pero no el grado de severidad de la lesión cervical.

**Palabras clave:** infecciones múltiples, virus del papiloma humano, captura híbrida II, carga viral relativa.

**ABSTRACT**

Cervical cancer caused by human papilloma virus (HPV), is the third most common cancer in women worldwide high-grade SIL (HSIL). Multiple infections were detected in 37/123 women (30.1%). NSIL women had lower frequency of multiple infections (5.6%) than women with SIL (34.3%) ( $p = 0.03$ ). There was not observed increased frequency of multiple infections with the severity of the lesion, presenting women with LSIL a frequency of 34.6% and women with HSIL 33.3%. There was not observed a significant difference between relative viral load in multiple and simple infection, suggesting that in multiple infections may be only one type of HPV are replicating and causing a productive infection. In addition, we observed a high frequency of multiple infections (75%) in women under 30 years old. Finally, the results suggest that multiple infections could

\*Autor correspondiente: **Dra. Laura Mendoza**, Dpto. Salud Pública y Epidemiología, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Rio de la Plata y Lagerenza. Asunción, Paraguay. Email: lauramendozatorres@gmail.com; saludpublica@iics.una.py.  
Fecha de recepción: Junio de 2012; Fecha de aceptación: Noviembre de 2012

orient SIL's presence but not the severity of the cervical lesion.. The aim of this study was to determine by polymerase chain reaction followed by reverse hybridization the frequency of multiple infections in women positive for high-risk oncogenic HPV by Hybrid Capture II, according to the severity of squamous intraepithelial lesion (SIL), relative viral load and age, period 2007-2011. This cross sectional study included 123 women attending at the Research Institute in Health Sciences, 18 without cervical lesion (NSIL), 78 with low-grade SIL (LSIL) and 27 with

**Keywords:** multiple infections, human papillomavirus, Hybrid Capture II, relative viral load.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino causado por el virus del papiloma humano (HPV), constituye el tercer tipo de cáncer más común que afecta a las mujeres en el mundo, se estiman 529.828 nuevos casos y 275.128 muertes por año aproximadamente; el 85% de dichos casos nuevos ocurre en países en vías de desarrollo. La tasa de incidencia estandarizada por edad en América del Sur es de 24,1x100.000 mujeres. En Paraguay la incidencia es muy superior a las observadas en otros países vecinos, siendo la tasa de incidencia 35,0x100.000 mujeres y la tasa de mortalidad 16,6x100000 mujeres (1,2).

La forma de transmisión más frecuente del HPV es el contacto sexual. Los genotipos de HPV que infectan el tracto genital femenino, se han clasificado según el potencial oncogénico para el desarrollo de lesiones preneoplásicas o neoplásicas en 2 grupos: de bajo riesgo (LR-HPV) y de alto riesgo (HR-HPV). Los genotipos de bajo riesgo más frecuentes son los HPV: 6, 11, 43 y 44 y se asocian con condilomas o neoplasias cervicales intraepiteliales de bajo grado. En el grupo de alto riesgo 15 tipos de HPV han sido identificados (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (3,4).

Entre métodos moleculares para la detección del HPV se encuentran la captura de híbridos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que pueden detectar el tipo viral presente. La captura híbrida II (CH II), es una prueba disponible comercialmente que puede detectar 13 tipos de HR-HPV. El método de CH II proporciona también el valor de la carga viral relativa (5). Mientras que la PCR asociada a hibridación reversa (PCR-RLB) permite detectar e identificar 37 tipos específicos de HPV (3, 5,6).

Con respecto a las infecciones múltiples de tipos de HPV, se han realizado trabajos que demuestran que estas son relativamente frecuentes y poseen un significado controversial en relación a su asociación con el desarrollo de cáncer de cuello uterino (7,8). Al respecto, ciertas investigaciones señalan que las pacientes con citología anormal e infección múltiple por HR-HPV podrían considerarse de mayor riesgo para el desarrollo de lesiones de cuello uterino y cáncer. Así mismo, se considera que la infección múltiple podría favorecer la persistencia de un tipo viral oncogénico específico, sin embargo, esto aun no está claro (7,9-12).

Los estudios de Bachtary y van der Graaf (2002) sugieren que la infección múltiple está asociada con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Pero aun falta determinar si esto es debido a la susceptibilidad del hospedero, la interacción entre los virus o la probabilidad de progresión independiente en cada tipo viral (13).

Ya que trabajos anteriores presentan resultados contradictorios entre la relación que existe entre la presencia de infecciones múltiples, la carga viral relativa del virus, y en nuestro país aun no existen estudios sobre ello, el objetivo del presente trabajo es determinar la frecuencia de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para HR-HPV por métodos moleculares, según carga viral relativa y edad, en el periodo 2007-2011.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño**

Se llevó a cabo un estudio observacional de corte transverso con componente analítico.

Fueron incluidas 123 mujeres que acudieron al IICS-UNA en el período 2007-2011, a fin de realizarse por indicación médica la detección de HR-HPV por CH II. Las mujeres presentaron un rango de edad de 16 a 72 años con una mediana de edad de 28 años (IC<sub>25-75%</sub> 24-38 años) y fueron procedentes de Asunción y sus alrededores. Indicar lugar de residencias de las personas, edades, ocupación, etc.

Las mujeres fueron seleccionadas en forma consecutiva. Los criterios de inclusión establecidos fueron: poseer un resultado de CH II positivo para HR-HPV, un resultado de citología y no haber tenido un tratamiento previo.

### **Detección de HR-HPV por CH II y clasificación de la carga viral relativa**

Inicialmente las muestras cervicales de las mujeres que participaron del estudio fueron colectadas con un cepillo endocervical y transportadas en un tubo colector proveído por Qiagen, (Gaithersburg, MD, USA). Las mismas fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

El procesamiento se llevó a cabo por el método de CH II, proceso que produce señales de luz aproximadamente proporcionales a la cantidad de ADN del HPV presente en la muestra, siendo capaz de detectar el ADN de 13 tipos de HPV de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68).

La luz emitida fue medida por un luminómetro en unidades relativas de luz (URL). El valor de carga viral relativa se observó comparando las URL de la muestra con las del control positivo (URL/CP). Se consideró positiva la muestra con valores de URL/CP  $\geq 1,0$  pg/mL (6).

Los valores de carga viral relativa obtenidos por este método fueron clasificados en cuatro categorías según sus valores; de 1 a menores que 10 pg/mL: carga viral baja, de 10 a menores que 100 pg/mL: carga viral intermedia, de 100 a menores que 1000 pg/mL: carga viral alta e igual o mayores que 1000 pg/mL: carga viral muy alta (6).

### **Detección de tipos de HPV por PCR-RLB en muestras positivas para HR-HPV por CH II**

Todas las muestras positivas para HR-HPV por CH II fueron tipificadas utilizando cebadores GP5p y GP6p biotinilados. Estos cebadores poseen una región blanco de 140 pb en la región viral L1. Los productos de GP-PCR se tipificaron por hibridación reversa con sondas tipo específicas que contenían los 13 tipos de HR-HPV detectados en CH II. Las reacciones positivas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando el *Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit*, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Buckinghamshire, Reino Unido). En la PCR realizada fueron utilizados ADN celular CaSki y HeLa (con 16 y 18 secuencias de HPV, respectivamente) como controles positivos y agua como control negativo (sin plantilla de ADN).

Fue considerada una infección múltiple cuando se detectó más de un tipo viral de HR-HPV.

### **Detección de lesiones de cuello uterino**

El diagnóstico citológico se realizó por una profesional ginecóloga según el Sistema Bethesda 2001. Los resultados fueron clasificados en mujeres negativas para lesión escamosa intraepitelial (NSIL), lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL), que incluye la neoplasia cervical intraepitelial de grado 1 (CIN I) y/o HPV; y en lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL), que incluye neoplasia cervical intraepitelial de grado 2 (CIN II) (14). Todos los resultados de LSIL y HSIL fueron confirmados histológicamente.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron cargados en una planilla de Excel, las frecuencias fueron expresadas en porcentaje y las mismas fueron presentadas en tablas y gráficos. La comparación de proporciones se realizó por chi cuadrado utilizando el programa de Epi-Info (Versión 3.4.3; 2007). Se consideró estadísticamente significativo valores de  $p < 0,05$ .

## ASUNTOS ÉTICOS

Las mujeres incluidas firmaron un consentimiento informado en el marco del proyecto aprobado por el Comité de Ética del IICS, UNA (P10/07). Todos los datos fueron procesados respetando la confidencialidad de las mujeres incluidas en el presente estudio.

## RESULTADOS

De las 123 mujeres, 18 (14,6%) presentaron NSIL, 78 mujeres (63,4%) presentaron LSIL y 27 mujeres (21,9%) HSIL. Además, 86/123 mujeres (69,9%) presentaron infección simple, mientras que 37 (30,1%) presentaron infección múltiple por HPV. De las 37 infecciones múltiples 67,6% (25 infecciones) fueron de 2 tipos virales, 21,6% (8 infecciones) de 3 tipos virales y el 10,8% (4 infecciones) de 4 tipos virales.

Las mujeres con NSIL presentaron 5,6% de infecciones múltiples, mientras que las mujeres con SIL presentaron una frecuencia de infecciones múltiples significativamente mayor de 34,3% ( $p=0,03$ ).

En relación al diagnóstico citológico, se observó una frecuencia similar de infecciones múltiples en mujeres con HSIL (33,3%) y mujeres con LSIL (34,6%), ( $p=0,9$ ). En la tabla 1 se observa la frecuencia de infecciones simples y múltiples según el grado de lesión cervical.

**Tabla 1.** Frecuencia de infecciones simples y múltiples según el grado de lesión cervical de 123 mujeres positivas para el virus del papiloma humano de alto riesgo por métodos moleculares, periodo 2007-2011.

Tipo de infección	NSIL	SIL N° (%)			P
		LSIL	HSIL	TOTAL	
Infección simple	17(94,4)	51 (65,4)	18 (66,7)	69 (65,7)	0,03
Infección múltiple	1(5,6)	27 (34,6)	9 (33,3)	36 (34,3)	0,03
<b>Total</b>	<b>18 (100)</b>	<b>78 (100)</b>	<b>27 (100)</b>	<b>105 (100)</b>	

NSIL: sin lesión escamosa intraepitelial LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado.

Las infecciones múltiples comparadas a las infecciones simples no presentaron un aumento significativo de la carga viral relativa en mujeres con NSIL, LSIL y HSIL. Los resultados son mostrados en la tabla 2.

**Tabla 2.** Frecuencia de infecciones múltiples según la carga viral relativa y el grado de lesión intraepitelial de 123 mujeres positivas para el virus del papilomavirus humano por métodos moleculares, periodo 2007-2011.

Carga viral relativa	NSIL			LSIL			HSIL		
	IS N° (%)	IM N° (%)	P	IS N° (%)	IM N° (%)	P	IS N° (%)	IM N° (%)	P
Baja	2 (11,8)	0	1	9 (17,6)	2 (7,4)	0,31	2 (11,1)	1 (11,1)	1
Intermedia	6(35,3)	0	1	12(23,5)	9 (33,3)	0,35	3 (16,7)	2 (22,2)	1
Alta/muy alta	9 (52,9)	1(100)	1	30(58,8)	16(59,2)	0,97	13(72,2)	6(66,7)	1
<b>TOTAL</b>	<b>17(100)</b>	<b>1 (100)</b>		<b>51(100)</b>	<b>27 (100)</b>		<b>18 (100)</b>	<b>9 (100)</b>	

NSIL: sin lesión escamosa intraepitelial; LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado; IS: infección simple; IM: infección múltiple

De las 37 mujeres incluidas en el estudio con infecciones múltiples se observó que el 75,7% (28/37) de las mismas fueron mujeres de 30 años o menores. Además, en relación a la severidad de la lesión, tanto las mujeres con LSIL y HSIL presentaron una distribución similar de infecciones múltiples, siendo la mayor frecuencia del 78% (21/27 mujeres con LSIL) y 67% (6/9 mujeres con HSIL) observada en mujeres de 30 años o menos (tabla 3).

**Tabla 3.** Distribución de 37 mujeres con infecciones múltiples por el virus del papiloma humano de alto riesgo según edad y carga viral relativa, periodo 2007-2011

Carga Viral Relativa	LSIL con IM N° (%)		LSIL con IM N° (%)		HSIL con IM N° (%)	
	≤30 años	>30 años	≤30 años	>30 años	≤30 años	>30 años
<b>Baja</b>	0	0	1 (4,8)	1 (20)	0 (0)	1 (33,3)
<b>Intermedia</b>	0	0	9 (42,8)	0 (0)	1 (16,7)	1 (33,3)
<b>Alta</b>	1	0	6 (28,6)	2 (40)	2 (33,3)	0 (0)
<b>Muy alta</b>	0	0	5 (23,8)	3 (50)	3 (50)	1 (33,3)
<b>TOTAL</b>	<b>1 (100)</b>	<b>0</b>	<b>21 (100)</b>	<b>6 (100)</b>	<b>6 (100)</b>	<b>3 (100)</b>

NSIL: sin lesión escamosa intraepitelial; LSIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

## DISCUSIÓN

En el Paraguay el cáncer de cuello uterino, debido a la magnitud de la enfermedad y al aumento de la tasa de incidencia y mortalidad año tras año, puede considerarse como una prioridad de salud pública. Por ello, resulta de suma importancia el empleo de métodos diagnósticos moleculares que permitan detectar el tipo de HPV y la carga viral relativa del virus, complementando la citología convencional (6,15).

En el presente estudio se determinó la frecuencia de infecciones múltiples en mujeres con y sin lesión de cuello uterino positivas para HR-HPV por métodos moleculares, según carga viral relativa y edad. De las 123 mujeres incluidas, se observó infección múltiple en el 30,1% de las mismas. Diversos estudios han detectado frecuencias de infecciones múltiples variables, desde menores al 10% hasta más del 80%(16-19). Estudios previos sugieren que esta variabilidad podría deberse a la diferencia entre las metodologías moleculares utilizadas para la tipificación viral, factores demográficos y clínicos, entre otros (16-19).

En los resultados del presente estudio se observó mayor frecuencia de las infecciones múltiples en las mujeres con SIL comparadas con las mujeres que no presentaron lesión de cuello uterino ( $p=0,03$ ). Estos datos están en concordancia con el estudio realizado por Ripabelli y colaboradores (2010), en el cual se encontró infecciones múltiples en un 13,6% de las mujeres con hallazgos normales de cuello uterino, comparado con 36,8% de infecciones múltiples en pacientes con resultados anormales del cuello uterino.

Además, otros estudios encontraron un aumento de frecuencia de infecciones múltiples en las mujeres con SIL, sugiriendo así que las infecciones múltiples podrían ser utilizadas para orientar la presencia de SIL (19-21).

Se observó que tanto en las mujeres con LSIL y HSIL, las infecciones múltiples presentaron una frecuencia similar del 34,6% y 33,3% respectivamente ( $p=0,9$ ). Estos resultados sugieren que las infecciones múltiples no permiten orientar el grado de severidad de la lesión de cuello uterino. Esto concuerda con lo observado en el estudio realizado por Sotlar y colaboradores, 2004, en el cual se observó que en 1699 mujeres, las que poseían infección múltiple no presentaron un aumento significativo en el riesgo de desarrollar una lesión de cuello uterino al compararlas con mujeres infectadas con un solo genotipo viral (22). Además, se encuentra en concordancia con el estudio de Mejlhede y col 2009, que incluyó 1000 mujeres, en el cual se observó que las infecciones múltiples, presentaron una ocurrencia similar en los diferentes grados de lesión (23).

En el presente trabajo las infecciones múltiples comparadas a las infecciones simples no presentaron un aumento significativo de la carga viral relativa en mujeres con NSIL, LSIL y HSIL. Por tanto, estos resultados sugieren que la carga viral no puede diferenciar entre una infección simple o múltiple, esto probablemente puede deberse a que solo uno de los tipos virales implicados en la infección múltiple se esté replicando productivamente y sea responsable de causar la lesión. En concordancia con el trabajo de Quint y col (2009), que utilizó la técnica de microdissección por captura láser (LCM) combinada con la PCR (LCM-PCR), encontró que aunque muchos virus pueden infectar a un mismo sitio anatómico a la vez, solamente un genotipo de los mismos es el causante de la lesión (un virus, una lesión) (24).

Del total de las mujeres con infección múltiple (con NSIL, LSIL o HSIL), el 75,7% de las mismas presentó una edad menor a 30 años. Estos resultados concuerdan con los observados en otros estudios donde se detectaron mayores frecuencias entre 61% y 59% de infecciones múltiples en este rango etáreo (23,25). Esto puede atribuirse a que las mujeres poseen una mayor actividad sexual, lo cual puede estar asociado con la transmisión de múltiples tipos de HPV (18,23). Por lo tanto, la edad podría ser un factor importante a tener en cuenta al considerar la carga viral relativa como orientador del diagnóstico. Se ha informado que las mujeres menores de 30 años poseen mayor probabilidad de presentar infecciones múltiples con carga viral alta o muy alta, siendo en la mayoría de los casos infecciones esporádicas, que son eliminadas por el sistema inmune (19). Por ello, estas mujeres deberían realizarse un control a fin de detectar las infecciones persistentes que podrían causar cáncer de cuello uterino.

En el presente estudio se observó que a pesar del tamaño de muestra pequeño de infecciones múltiples, que éstas podrían orientar la presencia de SIL, pero no el grado de severidad de la lesión. Además, sugieren que en una infección múltiple probablemente un solo tipo viral se replica productivamente. En relación a la edad, debe considerarse que la misma es un factor importante a tener en cuenta, ya que mujeres por menores de 30 años positivas para HR-HPV deberían realizarse un control para identificar las infecciones persistentes. Finalmente, estos resultados servirán como base para realizar otros estudios con un mayor número de individuos donde se realicen comparaciones entre la frecuencia de tipos detectados en las infecciones simples y múltiples, según carga viral relativa y severidad de la lesión.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Alejandra Picconi, Jefa del Servicio de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "Dr. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, por su colaboración en el asesoramiento y tipificación de las muestras por la técnica de PCR-RLB.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-29.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN. *Int J Cancer.* 2010;127:2893-917.
3. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
4. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(4):244-65.
5. Bosch FX, De Sanjosé S, Castellsagué X. Virus de papiloma humano: riesgo oncogénico y nuevas oportunidades para la prevención. *An Sist Sanit Navar.* 2001;24:7-14.
6. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN 3 or cervical cancer. *Lancet.* 2002;360(9328):228-9.
7. Spinillo A, Dal Bello B, Gardella B, Roccio M, Diletta Dacco M, Silini EM. Multiple human papillomavirus infection and high grade cervical intraepithelial neoplasia among women with cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 2009;113:115-9.
8. Toro M, Fernandez A. Detección de virus papiloma humano (HPV) a partir de muestras celulares de cuello uterino en base líquida: Correlación con la inmunorreactividad de la proteína p16INK4a. *Invest. Clín.* 2011;52(1):3-14.
9. Ho GY, Einstein MH, Romney SL, Kadish AS, Abadi M, Mikhail M, et al. Risk factors for persistent cervical intraepithelial neoplasia grades 1 and 2: managed by watchful waiting. *J Low Genit Tract Dis.* 2011;15(4):268-75.
10. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Brocker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells.* 1989;7:209-14.
11. Van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJ, Snijders PJ. GP5p/6p PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol.* 2002;40:779-87.
12. Li N, Dai M. Relationship between multiple infection of human papillomavirus and cervical neoplasia among Chinese women in urban areas. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2010;44(5):423-6.
13. Bachtiry B, Obermair A, Dreier B. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer.* 2002;102(3):237-43.
14. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. For the Forum Group Members and the Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System. Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA.* 2002;287:2114-9.
15. Lewis, Merle J. Análisis de la Situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washington DC:OPS/OMS; 2004.
16. Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, et al. HPV testing in primary screening of older women. *BrJ Cancer.* 1999;81(3):554-8.
17. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papilloma virus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:244-65.
18. Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, et al. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1274-80.
19. Ripabelli G, Grasso G, Del Riccio I, Tamburro M, Sammarco M. Prevalence and genotype identification of human papillomavirus in women undergoing voluntary cervical cancer screening in Molise, Central Italy. *Cancer Epidemiology.* 2010;34(2):162-7
20. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* 2005;191:1796-807.
21. Kjaer SK, Breugelmans G, Munk C, Junge J, Watson M, Iftner T. Population-based prevalence, type- and age-specific distribution of HPV in women before introduction of an HPV-vaccination program in Denmark. *Int J Cancer.* 2008;123:1864-70.
22. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N et al. Detection and typing of human papilloma virus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:3176-84.

23. Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS*. 2009;117:108–14.
24. Quint W, Molijn A, Colau B, van der Sandt M, Jenkins D. One virus, one lesion--individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol*. 2012 May;227(1):62-71.
25. Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis*. 2008;35:276–82.