

ARTICULO ORIGINAL

Frecuencia y carga viral relativa del virus del papiloma humano de alto riesgo según el diagnóstico citológico en mujeres paraguayas por captura híbrida II

Frequency and relative viral load of high risk human papilloma virus according to the cytological diagnosis in Paraguayan women by hybrid capture II

***Mendoza LP, Páez M, Insaurrealde A, Rodríguez MI, Castro A, Kasamatsu E**

Departamento de Salud Pública y Epidemiología. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es el tumor maligno más frecuente en mujeres de Latinoamérica y su agente causal es el virus del papiloma humano (HPV). Recientemente en Paraguay incorporamos el método de captura híbrida II (CH II), el cual detecta 13 tipos de HPV de alto riesgo oncogénico (HR-HPV) y proporciona valores relativos de carga viral. El objetivo del estudio fue determinar la carga viral relativa de HR-HPV por CH II según el diagnóstico citológico. Fueron incluidas 566 mujeres (33 ± 10 años) atendidas en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud 2006/2009. Fue detectado HR-HPV en 43% de las mujeres (241/566), observándose una alta frecuencia del 23% en mujeres con ausencia de lesión intraepitelial (NSIL). Según el diagnóstico citológico, se evidenció una diferencia altamente significativa entre los valores de carga viral relativa ($p < 0,0001$; Kruskal Wallis), observándose un aumento de carga viral relativa de mujeres con NSIL a mujeres con SIL (68 pg/ml en ausencia de SIL; 710 pg/ml para SIL de bajo grado-LSIL y 474 pg/ml para SIL de alto grado-HSIL). No se observó cambio significativo en la carga viral relativa entre LSIL y HSIL ($p = 0,60$; prueba t de Student). Los resultados sugieren que los valores de carga viral relativa proporcionados por CH II pueden ser considerados como un indicador importante en el manejo de mujeres con sospecha de SIL.

Palabras claves: Carga viral relativa; virus del papiloma humano de alto riesgo; captura híbrida II; diagnóstico citológico.

ABSTRACT

Cervical cancer is the most frequent malignant tumor in women of Latin America being human papillomavirus (HPV) the main causative agent. Recently in Paraguay, we incorporated the method of hybrid capture II (CH II) which detects 13 types of HPV of high oncogenic risk (HR-HPV) and provides relative values of viral load. The aim of this study was to determine the frequency and relative viral load of HR-HPV by CH II according to the cytological diagnosis. There were 566 women (33 ± 10 years) included in the study that attended the Research Institute in Health Sciences during the period 2006/2009. HR-HPV was detected in 43% of the women (241/566), being observed a high frequency of 23% in women negative to squamous intraepithelial lesions (NSIL). According to the cytological diagnosis, there was a highly significant difference between the values of relative viral load ($p < 0.0001$; Kruskal Wallis), with an increase of relative viral load of women with NSIL to women with SIL (mean values: 68 pg/ml in NSIL; 710

*Autor Correspondiente: **Dra. Laura Mendoza**, Dpto. de Salud Pública y Epidemiología
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay
Email: lauramendozares@gmail.com
Fecha de recepción: abril de 2010, Fecha de aceptación: junio de 2010

pg/ml in low grade SIL-LSIL and 474 pg/ml in high grade SIL-HSIL). Significant change was not observed in the relative viral load between LSIL and HSIL ($p=0.60$; Student's t test). The results suggest that the values of relative viral load provided by CH II could be considered an important indicator for managing women with suspicion of SIL.

Keywords: Relative viral load; high risk human papilloma virus; hybrid capture II; cytological diagnosis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es el tumor maligno más frecuente en la población femenina de los países latinoamericanos, entre los cuales, el Paraguay ocupa el tercer lugar en incidencia con una tasa de 53,2x100.000 mujeres (1,2).

El virus del papiloma humano (HPV) es la causa principal del cáncer cervical (3,4). Aproximadamente 40 tipos de HPV infectan la mucosa cervical y son clasificados como HPV de bajo riesgo oncogénico (LR-HPV) o HPV de alto riesgo oncogénico (HR-HPV) basados en asociaciones epidemiológicas conocidas (4). HR-HPV son detectados en más del 99% de los casos de carcinoma cervical (4,5). Por ello, es importante evaluar la presencia de los tipos de HPV en las pruebas realizadas para el cribado del cáncer de cuello uterino.

Los métodos morfológicos convencionales utilizados en la detección de lesiones cervicales son, el estudio citológico cérvico-vaginal (Papanicolaou-Pap), la colposcopia y el estudio histopatológico, de los cuales, el estudio citológico es el método más sencillo y de bajo costo para detectar el efecto citopático del HPV mediante la observación de células coilocíticas. La desventaja de los métodos convencionales es que no permiten determinar el tipo de HPV y su carga viral (6).

El HPV no puede ser aislado en células, por ello las pruebas diagnósticas dependen de técnicas moleculares como el método de captura híbrida II (CH II) que permite detectar en forma rápida el ADN viral de 18 tipos de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico, con una sensibilidad de 1 pg/ml de ADN viral. Además, esta técnica molecular proporciona valores de carga viral relativa siendo la única aprobada por la *Food and Drugs Administration-FDA* (7).

A pesar que la relación existente entre la carga viral y el grado de severidad de la lesión ha sido investigada por varios estudios, la misma aún no está clara (8-11). Estudios actuales han sugerido que la carga viral de HR-HPV permite orientar el seguimiento de mujeres con sospecha de lesiones cervicales (12,13).

Considerando que el Paraguay posee una alta incidencia de cáncer de cuello uterino, el objetivo de este estudio descriptivo de corte transversal, es determinar la frecuencia y la carga viral relativa de HR-HPV detectada por CH II® según el diagnóstico citológico en mujeres paraguayas, a fin de proporcionar a los profesionales una herramienta diagnóstica complementaria a los métodos convencionales de modo a orientar el manejo clínico de las pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Fueron incluidas 566 mujeres remitidas para realizarse la determinación de HPV de alto riesgo al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción entre mayo del 2006 a abril del 2009.

Las participantes fueron seleccionadas en forma consecutiva siguiendo criterios previamente establecidos como tener un diagnóstico citológico que indique presencia o ausencia de lesión escamosa intraepitelial dentro del año correspondiente y sin histerectomía total. Los diagnósticos citológicos fueron corroborados con resultados de anatomía patológica de las mujeres seleccionadas. La edad promedio de las participantes

fue de 33 ± 10 años (rango de 14 a 72 años). Todos los datos fueron procesados respetando la confidencialidad.

Diagnóstico Citológico

Los resultados de citología cervical fueron clasificados según la terminología de Bethesda 2001 (14):

- Sin alteraciones: negativa para lesión escamosa intraepitelial o malignidad (N-SIL).
- ASCUS: presencia de células escamosas alteradas de significado incierto.
- SIL bajo grado (L-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado.
- SIL de alto grado (H-SIL): lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado.
- Carcinoma

Detección de HR-HPV y determinación de su carga viral relativa por el método de CH II ®

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

El procesamiento se llevó a cabo por el método de CH II que detecta el ADN de 13 tipos de HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Este método consiste en un proceso que produce señales de luz aproximadamente proporcionales a la cantidad de ADN del VPH presente en la muestra.

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.

La carga viral relativa fue dividida 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 (15).

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los datos fue realizado empleando estadística descriptiva y analítica (EpiInfo versión 3.2, 2004).

La comparación de los valores de carga viral relativa en los diferentes diagnósticos citológicos fue realizada utilizando la prueba de Kruskal Wallis o la prueba de t Student para estadística no paramétrica o paramétrica respectivamente, considerando estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En relación al diagnóstico citológico, 352 de las 566 (62%) mujeres participantes del estudio presentaron un resultado de N-SIL, 192 (34%) presentaron L-SIL y 22 (4%) presentaron H-SIL.

La frecuencia de HR-HPV detectada por el método de CH II ® fue de 43% (241/566 mujeres). Se observó la presencia de HR-HPV en un 23% de mujeres con N-SIL, 72% con L-SIL y 95% con H-SIL. Los resultados son mostrados en la tabla 1.

Se evidenció una diferencia significativa entre los valores de carga viral relativa de HR-HPV de las 241 muestras de mujeres con diagnósticos citológicos de NSIL, LSIL y HSIL positivas por CH II ($p < 0,0001$; Kruskal Wallis). Se observó una mayor carga viral relativa en mujeres con SIL en relación a aquellas con diagnóstico de NSIL, siendo los valores de medianas obtenidos para mujeres con N-SIL de 68 pg/mL (percentil $_{25\%-75\%}$ 28–234), con L-SIL de 710 pg/mL (percentil $_{25\%-75\%}$ 84–1539) y con H-SIL de 474 pg/mL (percentil $_{25\%-75\%}$ 46–1381). No se observó una diferencia significativa de la carga viral relativa entre LSIL y HSIL ($p = 0,60$ -prueba de t Student).

La distribución de carga viral relativa de HR-HPV según diagnóstico citológico de 133 mujeres positivas para HR-HPV menores de 30 años y de 108 mujeres de 30 años o más es mostrada en la Tabla 2. Fue observada una diferencia significativa entre los valores de mediana de carga viral relativa en los diferentes diagnósticos citológicos de cada grupo, obteniéndose una p de 0,0001 para menores de 30 años y una p de 0,0028 para 30 años o más (Kruskal Wallis). Es interesante resaltar que a pesar que los valores de mediana de carga viral relativa de HR-HPV observados en las mujeres menores de 30 años en los diferentes diagnósticos citológicos, son más elevados que los presentados por las mujeres de 30 años o más, no se observaron diferencias significativas para los valores de carga viral entre ambos grupos para NSIL (p=0,11, Kruskal Wallis), LSIL (p=0,36, prueba t de Student) y HSIL (p=0,17, prueba t de Student).

La distribución de la carga viral relativa en las 241 mujeres positivas para HR-HPV por CH II en relación al diagnóstico citológico es mostrada en la Tabla 3. Cuarenta y uno de 82 (50%) mujeres con diagnóstico citológico de NSIL presentaron valores de carga viral bajos (menores a 10 pg/mL). Se evidenciaron valores de carga viral intermedios a muy altos en un 83% (115/138 mujeres) y 95% (20/21 mujeres) de mujeres positivas para HR-HPV con L-SIL y H-SIL, respectivamente.

Tabla 1. Resultados positivos para HPV de alto riesgo (HR-HPV) por el método de captura híbrida II en relación al diagnóstico citológico de 566 mujeres.

Citología	Positivo para HR-HPV	Total n°
	n° (%)	
N-SIL	82 (23)	352
L-SIL	138 (72)	192
H-SIL	21 (95)	22
Total	241 (43)	566

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial

L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

Tabla 2. Comparación entre valores de mediana de carga viral relativa de 133 mujeres positivas para HPV de alto riesgo menores de 30 y 108 de 30 años o más.

Citología	Carga viral de HR-HPV (pg/ml)			
	Menor a 30 años*		30 años o más**	
	Mediana	Percentil _{25%-75%}	Mediana	Percentil _{25%-75%}
N-SIL	60	18 – 319	30	6 – 121
L-SIL	696	62 – 1539	374	48 – 1049
H-SIL	1321	899 – 1442	257	35 – 1212

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial

L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

*Kruskal Wallis p=0,0001

**Kruskal Wallis p = 0,0028

Tabla 3. Distribución de la carga viral relativa en 241 mujeres positivas para HR-HPV detectada por el método de captura híbrida II en relación al diagnóstico citológico.

Citología	Carga viral de HR-HPV (pg/mL)				Total
	1 a < 10 n° (%)	10 a <100 n° (%)	100 a <1000 n° (%)	≥1000 n° (%)	
N-SIL	41 (50)	21 (26)	16 (20)	4 (5)	82
L-SIL	23 (17)	30 (22)	39 (28)	46 (33)	138
H-SIL	1 (5)	6 (29)	6 (29)	8 (38)	21
Total	65 (27)	57 (24)	61 (25)	58 (24)	241

N-SIL: negativa para lesión escamosa intraepitelial

L-SIL: lesión escamosa intraepitelial de bajo grado

H-SIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado

DISCUSIÓN

Considerando que en el Paraguay el cáncer de cuello uterino es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres y que el HR-HPV es su principal agente causal, es necesario utilizar herramientas diagnósticas moleculares complementarias a la citología que permitan detectar el tipo de HPV y cuantificar la carga viral, a fin de aumentar la eficacia de los métodos morfológicos convencionales utilizados para el cribado de cáncer de cuello uterino (2,16).

En el presente estudio se realizó la detección de HR-HPV y su carga viral relativa por el método de CH II en mujeres paraguayas remitidas al IICS, observándose presencia de infección viral en un 43% de las mujeres participantes. Este resultado es similar a otros estudios utilizando la misma metodología, lo cual indica que aproximadamente el 50% de las mujeres están infectadas con HPV, siendo considerado un problema de salud pública (7,17,18).

Se observó una frecuencia del 23% de HR-HPV en mujeres con N-SIL, lo que puede deberse a que el método de CH II posee casi un 100% de sensibilidad y de valor predictivo negativo (VPN), por tanto puede detectar presencia de infección por HR-HPV aun en ausencia de SIL (6, 16,19). Cabe destacar que debido a su alto valor de sensibilidad y VPN, el 77% de las mujeres con N-SIL y resultados negativos para HR-HPV presentan un riesgo reducido de desarrollar lesiones de cáncer de cuello uterino (19).

Se evidenció una frecuencia del 72% y 95% de HR-HPV en mujeres con LSIL y HSIL, respectivamente. Los resultados negativos para HR-HPV en mujeres con presencia de SIL pueden ser debidos a la toma de muestras cervicales con un bajo número de copias de ADN HR-HPV, a la infección por tipos de HPV no detectados por la CH II o por razones no identificadas, como errores técnicos durante el procesamiento de la muestra (18,20). Esto puede deberse también a errores en el diagnóstico citológico, el cual presenta aproximadamente un 20% de resultados falsos negativos y un 15% de resultados falsos positivos (18,20).

En cuanto a la carga viral de HR-HPV, varios trabajos demostraron una diferencia entre los valores de la misma en los diferentes diagnósticos citológicos, sugiriendo que a mayor carga viral existe un mayor riesgo de progresión para SIL y cáncer de cuello uterino infiltrante (7, 16, 17, 21,22). Resultados similares se han obtenido en este trabajo, obteniéndose valores mayores de carga viral relativa de HR-HPV en mujeres con diagnóstico citológicos de SIL en comparación con mujeres con ausencia de SIL.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la carga viral no cambia con la progresión de la lesión de un LSIL a un HSIL. Esto puede deberse al efecto combinado de varios factores, el primero porque las muestras de LSIL tienen una carga similar a las de HSIL o cáncer por CH II, en adición, las altas cargas virales relativas observadas en mujeres con diagnóstico de LSIL pueden deberse a infecciones múltiples con genotipos de

HPV detectados por CH II, las cuales se encuentran en mayor frecuencia en este tipo de lesión (51%) que en mujeres con citologías normales (32%) o cáncer (23%) (23).

Otros estudios sugieren que las mujeres jóvenes, por debajo de 30 años, tienden a presentar valores de carga viral más elevados, esto puede deberse a nuevas infecciones adquiridas y a la ausencia de un control por el sistema inmune (24,25). En este estudio se observó que el grupo de mujeres menores a 30 años presentó valores de carga viral relativa, según diagnóstico citológico, más elevados que las mujeres de 30 años o más, a pesar que la diferencia no fue significativa. Se sugiere realizar el análisis con un mayor número de muestras para verificar si la edad de la paciente es una variable que podría afectar la carga viral relativa, lo cual fue sugerido por otros trabajos (24,25).

Se observó una carga viral menor a 10 pg/mL en 50% (41/82) de mujeres con N-SIL, lo cual confirma el hallazgo de otros estudios, los cuales sugieren que debido a la poca especificidad del método de CH II, los valores bajos de carga viral relativa pueden representar resultados falsos positivos o infección por HPV sin una implicancia clínica futura (19,26). Estos resultados fueron confirmados con estudios de detección de HR-HPV por reacción de cadena de la polimerasa-PCR (26,27). Un 50% de mujeres con N-SIL presentaron valores de carga viral mayores a 10 pg/mL para HR-HPV. Esta falta de concordancia entre el diagnóstico citológico y molecular, puede deberse a la elevada sensibilidad del método molecular mencionada anteriormente, lo que le permite detectar infección por HR-HPV en tejidos aparentemente normales (13). Cabe destacar que mujeres con N-SIL y con valores altos y persistentes de carga viral mayores a 100 pg/mL tienen un mayor riesgo de desarrollar un H-SIL (13,19).

Basados en los resultados de carga viral de HR-HPV en relación al diagnóstico citológico obtenidos por estudios anteriores, se ha sugerido que valores por encima de 25 pg/mL (carga viral intermedia) sean considerados de significancia diagnóstica (9, 22,28). Estos resultados se encuentran en concordancia con los observados en el presente estudio, donde el 83% y 95% de mujeres positivas para HR-HPV con L-SIL y H-SIL respectivamente, presentaron valores de carga viral medios a muy altos.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran que una alta carga viral puede utilizarse como marcador de progresión de N-SIL a lesiones precancerosas (L-SIL o H-SIL), sin embargo, debe considerarse que una baja carga viral no puede excluir la progresión de la lesión (17,26). Por ello, es importante resaltar que tanto los valores de carga viral como su persistencia precisan ser interpretados conjuntamente con la evolución clínica del paciente (29).

En suma, se observó por el método de CH II una frecuencia del 23% de HR-HPV en mujeres con NSIL, sugiriendo al igual que otros estudios que el uso combinado de los mismos incrementa la eficacia de ambas pruebas en el cribado de cáncer de cuello uterino. Los resultados obtenidos demuestran que la cuantificación de carga viral relativa puede ser considerada un indicador importante en el seguimiento de mujeres con sospecha de SIL. Por tanto, actualmente se recomienda utilizar la combinación de métodos disponibles tanto convencionales como moleculares, a fin de obtener un diagnóstico confiable para el manejo terapéutico a seguir con la paciente.

BIBLIOGRAFIA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisan P. Global cancer staditics 2002. C A Cancer J Clin 2005 Mar-Apr; 55:74-108.
2. Lewis, Merle J. Análisis de la Situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Washington DC, 2004.
3. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 2002 Apr;55(4):244-65.
4. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic

classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6; 348(6):518-27.

5. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004 Feb; 103(2):304-9.

6. Dôres GB, Taromaru EK, Bonomi CG, Longatto A Filho, Gilli NP, Matsubara S, et al. HPV infection detected by hybrid capture II: correlation with morphological findings. *DST – J bras Doenças Sex Transm* 2005 17(4): 255-8.

7. Carvalho MOO, Almeida RW, Leite FMS. Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. *Braz J Infect Dis* 2003; 7(2): 121-5.

8. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of ASCUS. *Am J Obstet Gynecol* 1995 172:946-54.

9. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet* 2002; 76: 41-7.

10. Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S, et al. Distribution and viral load of type specific HPV in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J Clin Pathol* 2001 May; 54 (5): 377-80.

11. Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, et al. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Oct; 12 (10): 1038-44.

12. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006 Mar 1; 118 (5): 1187-93.

13. Tulio S, Pereira LA, Neves FB, Piazzetta Pinto A. Association between high-risk human papillomavirus DNA load detected by hybrid capture II and high-grade precursor lesions of cervical cancer in women. *J Bras Patol Med Lab* 2007 Feb; 43 (1): 31-5.

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. 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 Jul 20; 360 (9328): 228-9.

16. Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003 Aug; 127 (8): 959-68.

17. Santos AL, Derchain SF, Martins MR, Sarian LO, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *Sao Paulo Med J* 2003 Nov 6; 121 (6): 238-43.

18. Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigao PH. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005; 9(5): 398-404.

19. Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer* 2002 Nov 15; 95(10): 2145-51.

20. Morrison H. Human papillomavirus absence predicts normal cervical histopathologic findings with abnormal papanicolaou smears. *J Hum Virol* 1993; 4: 283-7.

21. Ferreccio C, Bratti MC, Sherman ME, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A. A comparison of single combined visual cytologic, and virologic tests as screening strategies in region at high risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Sep; 12(9): 815-23.

22. Hernandez-Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003 Aug; 90(2): 310-7.

23. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, and Schiffman M. A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003; 12: 477-84.

24. Lillo FB, and Uberti-Foppa C. Human papillomavirus viral load: a possible marker for cervical disease in HIV-infected women. *J. Antimicrobial Chemother* 2006; 57: 810-14.

25. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:102-7.
26. Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SF, Sarian LO, Zeferino LC, Messias S. DNA recovery from hybrid capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *J Virol Methods* 2005 Jun;126(1-2):197-201.
27. Federschneider JM, Yuan L, Brodsky J, Breslin G, Betensky RA, Crum CP. The borderline or weakly positive hybrid capture II HPV test: a statistical and comparative (PCR) analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Sep; 191(3):757-61.
28. Tozetti IA, Scapulatempo ID, Levi JE, Ferreira AW. Determination of HPV DNA viral load by hybrid capture assay and its association with cytological findings. *J Bras Patol Med Lab* 2006 Dec;42(6):449-53.
29. Nieminen P, Vuorma S, Viikki M, Hakama M, Anttila A. Comparison of HPV test versus conventional and automation-assisted Pap screening as potential tools for preventing cervical cancer. *BJOG* 2004 Aug; 111(8):842-8.