

DETECCIÓN MOLECULAR Y GENOTIPIFICACIÓN DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO COMO TAMIZAJE DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO: POSIBILIDADES EN EL CONTEXTO PERUANO

Walter Li ^{1a}, Carlos Padilla ^{2b}, Ericson Gutiérrez ^{1c}, Gisely Hajar ^{1b}

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino (CCU) sigue siendo una importante causa de muerte en las mujeres de países en desarrollo, donde el tamizaje primario con citología cervical no ha logrado reducir la prevalencia de las fases avanzadas de la enfermedad. En este contexto, la detección molecular del virus de papiloma humano (VPH) ha demostrado ser una prueba más sensible que la citología cervical, y a la vez menos específico. Esta prueba podría utilizarse en el contexto peruano cuando hay presencia de células escamosas de significado incierto (ASCUS) para una mejor orientación preventiva y terapéutica. Adicionalmente, para mejorar la detección temprana de CCU podríamos incluir la identificación de genotipos del VPH al tamizaje con citología cervical; sin embargo, esto implicaría un alto costo en un plan nacional. Por lo tanto, es necesario realizar evaluaciones económicas de los métodos diagnósticos para el tamizaje primario de CCU teniendo en cuenta la epidemiología de la enfermedad y los costos asociados a nuestra realidad.

¹ Unidad de Análisis y Generación de Evidencias en Salud Pública, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

² Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

^a Médico oncólogo, ^b biólogo molecular, ^c médico especialista en Gestión en Salud.

Correspondencia

Gisely Hajar,
giselins@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La infección por virus de papiloma humano (VPH) es la infección de transmisión sexual más frecuente en el mundo, y principal agente causal de cáncer cérvico-uterino (CCU). A nivel mundial causa aproximadamente 266 000 muertes cada año, con una incidencia cercana a 528 000 nuevos casos, 85% de los cuales ocurren en los países en desarrollo. Desde la implementación de los métodos de diagnóstico precoz, los programas de prevención y la vacunación contra el VPH, aproximadamente un 75% de la mortalidad por CCU se ha reducido en los países desarrollados en comparación con hace 50 años ^(1,2).

Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en 2012 la incidencia de CCU en Perú fue alta (32,66 /100 000) en el contexto mundial, y la mortalidad una de las más altas en la región (11,99/100 000) ⁽³⁾.

En cuanto a la transmisión, aproximadamente el 75% de las mujeres se infectan con el VPH en algún momento de su vida, pero la mayoría lo adquiere en los primeros años de inicio de su actividad sexual. La infección persiste como subclínica y transitoria, y el sistema inmune llega a ejercer control de la infección ⁽⁴⁾.

Para el desarrollo del CCU se requiere de una infección persistente, aunque no todas las infecciones por VPH derivan finalmente en CCU. Hasta la fecha, se conocen aproximadamente 15 tipos de VPH identificados como de alto riesgo. Sin embargo, el VPH-16 y VPH-18 son los más prevalentes y responsables del 70% de los casos de CCU en el mundo ⁽⁵⁾.

La progresión hacia una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y cáncer cervical, casi siempre viene precedida de infección persistente por VPH ⁽⁶⁾. Asimismo, algunos factores como el consumo de

tabaco, las relaciones con múltiples parejas sexuales, el uso de anticonceptivos, la inmunosupresión^(7,8) y las infecciones concomitantes de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* o herpes genital favorecen la progresión de la infección por VPH hacia NIC⁽⁹⁻¹¹⁾.

El ADN del VPH se puede identificar entre el 75 y 95% de las lesiones intracervicales de alto grado. Por otra parte, la expresión de las proteínas virales E6 y E7 es una de las principales diferencias entre los serotipos oncogénicos y no oncogénicos, las cuales tienen influencia en mecanismos del control celular^(12,13).

El tamizaje con Papanicolaou es el estándar en los programas de América Latina y Perú, durante 50 años de su utilización no ha alcanzado el impacto esperado en reducción de la mortalidad por CCU, probablemente por la falta de pericia en los procesos intermedios de la técnica, seguimiento inadecuado de pacientes e incompleta implementación de los programas en el territorio nacional y su población de riesgo, y su consecuente disminución en la sensibilidad de la prueba⁽¹⁴⁾.

Por otra parte, se ha observado que la detección del ADN del VPH por biología molecular es una técnica más sensible que la citología cervical convencional. Sin embargo, presenta menor especificidad en mujeres jóvenes y su uso podría conducir a tratamientos innecesarios.^(15,16) Aun con estas limitaciones, los estudios randomizados que evaluaron la implementación de la detección de ADN del VPH como estrategia de tamizaje primario, mostraron un mayor descenso de lesiones cervicales de alto grado en comparación con la citología cervical cuando los pacientes se sometieron a un tratamiento después de un resultado positivo⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

En la actualidad, los recursos tecnológicos nos permiten identificar los serotipos y genotipos del VPH para una mejor orientación preventiva y terapéutica, incluso cuando aún no hay lesión visible y solo existen células escamosas de significado incierto (ASCUS)⁽²⁰⁾ los pacientes pueden beneficiarse con estas herramientas tecnológicas. Por otra parte, la combinación de la citología cervical y detección viral podría realizarse simultáneamente ofreciendo mayor sensibilidad al tamizaje actual⁽²¹⁾.

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*, género *Papillomavirus*. Su genoma presenta DNA circular de doble cadena. No posee envoltura viral. Su cápside está compuesta por 72 capsómeros que rodean el genoma del virus. Estos capsómeros están formados por dos proteínas estructurales, L1 que constituye el 80% de la proteína viral y L2 que es la proteína menor de la cápside⁽²⁴⁾. El genoma viral está dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR, *long control region*) que no tiene potencial para codificar; la región de las proteínas tempranas (E1-E8, *early*), y la región de las proteínas tardías (L1 y L2, *late*). Las proteínas E1 y L2 son necesarias para la replicación extracromosómica del virus y, por ende, para completar el ciclo vital del virus⁽²⁵⁾.

La importancia de su asociación con el CCU está relacionada a una infección persistente, así como infección por más de 15 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y posiblemente subtipos 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82)^(22,23). Cuando los VPH de alto riesgo (tipo 16 y 18) infectan la mucosa del cuello uterino, generan desregulación del ciclo celular con alteración de varios genes. Los genes p27KIP1, Ciclina E, CDK4, p16^{INK4A} y Rb se alteran tempranamente, mientras que la Ciclina D1, MDM-2, p53 y p21^{waf} son aberraciones que ocurren tardíamente en la carcinogénesis^(25,26).

La conversión neoplásica en un epitelio infectado por VPH es puntual y está directamente inducido por los oncogenes E6 y E7 de los tipos virales de alto riesgo, los cuales provocan inestabilidad cromosómica en las células basales y parabasales del epitelio involucrado^(27,28).

La expresión inmunohistoquímica del gen p16^{INK4a} en la neoplasia intraepitelial cervical, se manifiesta de manera difusa o en todo el espesor del epitelio, desde los niveles de NIC1 hasta NIC3, y parece ser un marcador de infección persistente con VPH de alto riesgo⁽²⁹⁾.

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VPH

Entre las técnicas que se emplean para detección y genotipificación del VPH se tienen:

- **Hybrid Capture 2 (HC2).** Es un método semicuantitativo no radiactivo. Se basa en la hibridación del DNA-VPH usando sonda de RNA que se complementa a una secuencia común para 13 tipos de VPH considerados de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), que reaccionan con anticuerpos monoclonales específicos que revelaran el virus por quimioluminiscencia⁽³⁰⁾. Estas características hacen que esta técnica sea muy sensible, y de fácil adopción en los laboratorio de rutina y ensayos clínicos, además de ser una técnica aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*).

La técnica HC2 presenta las siguientes ventajas: (1) fácil instalación y aplicación en los laboratorios de rutina; (2) no requiere personal con experiencia en técnicas moleculares; (3) presenta alta sensibilidad (96-98%), y (4) está Indicado en resultados de ASCUS.

Esta técnica también presenta varias limitaciones o desventajas. Primero, solo emite resultado positivo o negativo a VPH de alto riesgo, sin identificar el tipo viral específico. Segundo, sus resultados pueden ser hasta un 8% falsos negativos como consecuencia de una carga viral baja o por sustancias que interfieren en el ensayo, principalmente antifúngicos en crema o anticonceptivos en gel⁽³¹⁾. Finalmente, esta técnica puede presentar reacciones cruzadas con algunos tipos de VPH no oncogénicos⁽³²⁾.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** En la actualidad la PCR es el método más sensible para la detección de VPH; sin embargo, existen diferentes protocolos para detectar un amplio espectro de genotipos de VPH que utilizan partidores genéricos que reconocen secuencias específicas del genoma viral⁽³³⁾. Los protocolos, en su mayoría, usan juegos de oligonucleótidos dirigidos a la región del gen L1 altamente

conservadora entre los tipos virales. Entre ellos destaca el uso de los oligonucleótidos GP5+/6+ y los MY09/11 degenerados⁽³⁴⁻³⁶⁾. Para la tipificación de genotipos virales a partir de los productos de la amplificación, se utilizan distintos métodos: Southern Blot, Hibridación Dot Blot, fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), secuenciación y enzimoimmunoensayo⁽³⁷⁾.

La PCR para VPH puede verse alterada por la presencia de diversas sustancias que inhiben la reacción de amplificación. Por estas razones, la mayoría de laboratorios han incorporado la amplificación de un control interno, por ejemplo, la beta-globina se utiliza en cada ensayo de PCR como un indicador para detectar la inhibición potencial y/o integridad de la muestra. Esto es particularmente importante para muestras de tejido conservado en parafina, donde puede haber degradación del DNA; por tanto, se recomienda evaluar previamente la integridad de la muestra⁽³⁸⁾.

Entre los sistemas con mayor sensibilidad para determinar la infección por VPH destaca la PCR en tiempo real. Un método muy usado en estudios epidemiológicos y clínicos que permite estimar con gran precisión la carga viral⁽³⁹⁾. Asimismo, existen dos sistemas fundamentados en la PCR comúnmente utilizados para la detección de los genotipos del VPH^(40,41).

Aunque algunos genotipos del VPH pueden producir anomalías citológicas, no todos tienen implicancia clínica en el desarrollo de una probable lesión maligna, por ello es importante contar con la genotipificación del VPH. Factores que influyen como predictores para el desarrollo de lesiones de alto grado, son las infecciones persistentes por un mismo tipo de VPH de alto riesgo, como se observó en una cohorte de 354 mujeres con infección persistente por VPH de alto riesgo, donde el 9,3% desarrollaron una NIC3 (severa displasia) en un seguimiento de 33 meses⁽⁴²⁾. Otros factores que influyen como predictores de lesiones de alto riesgo son las infecciones múltiples permanentes⁽⁴³⁾.

PRUEBAS MOLECULARES Y TAMIZAJE DE CÁNCER CERVICAL

Los programas de detección precoz de CCU han ido variando desde su creación y, hasta la fecha, no han tenido un impacto positivo en la esperanza de vida de los pacientes⁽⁴⁴⁾, probablemente por alguna relación con el curso indolente de esta patología.

La prueba visual con ácido acético es el examen más simple y de menor costo para el tamizaje de CCU, usualmente se practica en países no desarrollados. Consiste en aplicar 3 a 5% de solución de ácido acético en el cuello del útero, donde se pueden visualizar lesiones marcadas por el químico. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad del 84% (66-96%) y 82% (64-98%) respectivamente, y una alta tasa de falsos positivos⁽⁴⁵⁾.

La citología cervical es el método más usado y durante mucho tiempo fue el estándar de oro para el tamizaje de CCU, aun con deficiencias y potenciales propias de la técnica, conservación y/o lectura. Su sensibilidad oscila entre 55-94% y varía de acuerdo al laboratorio, citologista, muestra adecuada y técnica de fijación; tal como lo demostró un metanálisis de 94 estudios de citología convencional con Papanicolaou y tres estudios con citología en base líquida que dieron una sensibilidad variada de 30 a 87%⁽⁴⁶⁾. En consecuencia, la sensibilidad varía entre países y la experiencia del laboratorio.

Los estudios de tamizaje de CCU en Norteamérica y Europa muestran que la detección molecular de VPH es más sensible que la citología cervical en la detección de lesiones NIC2 o superior (96,1% vs 53%) y, a la vez, menos específico (90,7% vs 96,3%)⁽⁴⁷⁾. Estas cifras son similares a un estudio canadiense donde incluyeron 10 000 mujeres, y encontraron una sensibilidad de 94,6% vs 55,4% con citología, y especificidad de 94,1% vs 96,8%⁽¹⁶⁾. Por otra parte, los resultados del estudio ATHENA realizado en 47 000 mujeres de EE.UU para comparar el rendimiento entre la identificación de DNA-VPH de tipo 16 y/o 18 versus citología líquida como *screening* de CCU, demostraron que el 10% de pacientes con resultado positivo a VPH tipo 16 o 18, tuvieron lesiones cervicales de alto grado que no habían sido detectados previamente en la citología cervical⁽⁴⁸⁾.

Los estudios más grandes orientados a comparar los métodos de tamizaje de CCU y su eficacia (Tabla 1), siguiendo a pacientes con resultado negativo tanto para ADN-VPH como para citología cervical durante 3 y 5 años, encontraron que la tasa de incidencia acumulada durante 3 años en mujeres con citología negativa previa fue de 0,5%, en comparación con una tasa de incidencia de 0,11% en mujeres que tuvieron ADN-VPH negativo⁽⁴⁹⁾.

Las recomendaciones actuales para la detección de cáncer cervical fueron realizadas de forma conjunta por la Sociedad Americana del Cáncer (ACS), la Sociedad Americana de Colposcopia y Patología Cervical (ASCCP) y la Sociedad Americana de Patología Clínica (ASCP) en el año 2012 y fueron aprobados en el Congreso Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) el mismo año^(51,52). Los acuerdos finales de este consenso fueron los siguientes:

- La detección del carcinoma cervical debe iniciarse a los 21 años, sin tener en cuenta la edad de inicio de relaciones sexuales o el estado de vacunación contra VPH. La prueba de tamizaje para este grupo debe ser exclusivamente con citología cervical cada 3 años hasta llegar a los 30 años de edad.
- En mujeres de 30 a 65 años, el tamizaje debe incluir citología cervical y detección de VPH cada 5 años, aunque realizar la citología cervical cada 3 años es aceptable.
- En mujeres >65 años, sin antecedentes de NIC2, o superior y que hayan tenido resultados negativos en controles previos puede suspenderse el tamizaje.
- Las mujeres con antecedentes de NIC2 o superior, deben seguir en vigilancia durante 20 años tras el seguimiento posterior al tratamiento inicial, independiente de si se han realizado histerectomía total o no.

Los estudios de costo-eficacia orientados a la introducción de nuevas tecnologías en programas de cribado de CCU, sectorizan los esfuerzos tanto económicos como en salud, en utilizar pruebas de alta sensibilidad y especificidad, y evaluar el costo conveniente de acuerdo a la prevalencia de CCU en cada población. Con esto sugieren que en países en desarrollo la citología podría ser el

Tabla 1. Riesgo de cáncer cervical y/o NIC3+ tras 3 y 5 años de resultado de ADN-VPH y citología negativa. Tasa incidencia acumulada

Autor	Población de estudio	Edad (años)	N =	Examen negativo de entrada	3 años NIC3+	5 años NIC3+	3 años cáncer	5 años cáncer
Gage	Kaiser	30–64	1011092	ADN-VPH	0,07	0,14	0,011	0,017
	Permanente			Citología	0,19	0,31	0,02	0,031
	Northern California							
Wright	ATHENA	25–93	42 209	ADN-VPH	0,34			
				Citología	0,78			
Ronco	4 ensayos europeos	20–64	176 464	ADN-VPH			0,0046	0,0087
				Citología			0,0154	0,036
Dillner	7 estudios europeos	>20	24 295	ADN-VPH	0,12	0,25		
				Citología	0,51	0,83		

método de elección, teniendo en cuenta que la población de mayor riesgo (30-50 años) podría realizarse el tamizaje 1 o 2 veces con una prueba de mayor costo y alta sensibilidad⁽⁵³⁾.

CONCLUSIONES

En resumen, sobre la base de la evidencia de la literatura, una de las discusiones clínicas y de salud pública en relación al CCU, es el programa de tamizaje en la población de riesgo. Nuestro país no es ajeno a esta realidad, ya que desde la implementación del tamizaje con citología cervical, no se ha conseguido disminuir la incidencia, ni la mortalidad por CCU. Por ello, se han buscado nuevas estrategias diagnósticas con tecnologías modernas que permitirían ampliar los periodos de tamizaje en el control de las pacientes y que ofrezcan ventajas adicionales como el aumento de la sensibilidad diagnóstica. La detección molecular del VPH es más sensible que la citología cervical, pero su especificidad es baja, independientemente de la técnica molecular utilizada; y su importancia radica en la disminución de la incidencia acumulada tanto a 3 como a 5 años. Sin bien la introducción de estas técnicas moleculares podría involucrar hasta

un grupo citológico determinado ASCUS, incluir la identificación molecular al tamizaje con citología cervical aumentaría la especificidad final, pero implicaría un alto costo incluirlo en un plan nacional. Finalmente, con estos antecedentes es necesario realizar evaluaciones económicas para pruebas de diagnóstico para el tamizaje primario de CCU, teniendo en cuenta la epidemiología de la enfermedad y los costos asociados a nuestra realidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quinn M, Babb P, Jones J, Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ* 1999;318(7188):904-8.
2. Willoughby BJ, Faulkner K, Stamp EC, Whitaker CJ. A descriptive study of the decline in cervical screening coverage rates in the North East and Yorkshire and the Humber regions of the UK from 1995 to 2005. *J Public Health (Oxf)* 2006;28(4):355-60.
3. International Agency for Research on Cancer Multicentric Cervical Cancer Study G. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [internet]. Ginebra: WHO; 2012 [citado el 01 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx>.

4. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102(5A):3-8.
5. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, *et al.* Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-56.
6. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169(2):235-40.
7. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical C. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(4):1060-9.
8. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical C, Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, *et al.* Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006;118(6):1481-95.
9. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, *et al.* Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(21):1604-13.
10. Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, *et al.* Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002;185(3):324-31.
11. Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(16):1120-30.
12. 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.
13. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004;50(1-2): 9-19.
14. Murillo R, Almonte M, Pereira A, Ferrer E, Gamboa OA, Jerónimo J, *et al.* Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 11:L37-48.
15. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, *et al.* Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 10: K29-41.
16. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, *et al.* Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579-88.
17. Rijkaart DC, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Bulkman NW, Heideman DA, *et al.* Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):78-88.
18. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, *et al.* Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(3):249-57.
19. Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, *et al.* Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet.* 2007;370(9601):1764-72.
20. Gage JC, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Castle PE, *et al.* Risk of precancer determined by HPV genotype combinations in women with minor cytologic abnormalities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(6):1095-101.
21. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006;20(2):253-66.
22. Sahasrabudde VV, Luhn P, Wentzensen N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. *Future Microbiol.* 2011;6(9):1083-98.
23. Syrjanen K, Kulmala SM, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, *et al.* Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008;29(2):114-22.
24. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 2003;307(1):1-11.
25. García-Tamayo J, Molina J, Blasco-Olaetxea E. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical: Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Investigación Clínica.* 2010;51:193-208.
26. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001;20(54):7874-87.
27. Duensing S, Munger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene.* 2002;21(40):6241-8.
28. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:383-91.
29. Hu L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS, Hughson MD. Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *Mod Pathol.* 2005;18(2):267-73.

30. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S43-51.
31. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.
32. Gravitt PE, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(5):1248-54.
33. 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 a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol.* 1990;71(Pt 1):173-81.
34. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):80-8.
35. Stoler MH. HPV for cervical cancer screening: is the era of the molecular pap smear upon us? *J Histochem Cytochem.* 2001;49(9):1197-8.
36. Herrington CS. Self testing for human papillomaviruses. *J Clin Pathol.* 2002;55(6):408-9.
37. Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, *et al.* Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(18):1477-84.
38. Dona MG, Ronchetti L, Giuliani M, Carosi M, Rollo F, Congiu M, *et al.* Performance of the linear array HPV genotyping test on paired cytological and formalin-fixed, paraffin-embedded cervical samples. *J Mol Diagn.* 2013;15(3):373-9.
39. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, *et al.* A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(6):477-84.
40. Monsonego J, Bohbot JM, Pollini G, Krawec C, Vincent C, Merignargues I, *et al.* Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol.* 2005;99(1):160-8.
41. Sandri MT, Lentati P, Benini E, Dell'Orto P, Zorzino L, Carozzi FM, *et al.* Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol.* 2006;44(6):2141-6.
42. Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, *et al.* Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 1999;354(9172):20-5.
43. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, *et al.* Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.* 2001;286(24):3106-14.
44. Baker E. Assessing the impact of new cervical cancer screening guidelines. *MLO Med Lab Obs.* 2013;45(2):28-9.
45. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, *et al.* HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1385-94.
46. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, *et al.* Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000;132(10):810-9.
47. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, *et al.* Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1095-101.
48. Wright TC, Jr, Stoler MH, Sharma A, Zhang G, Behrens C, Wright TL, *et al.* Evaluation of HPV-16 and HPV-18 genotyping for the triage of women with high-risk HPV+ cytology-negative results. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(4):578-86.
49. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, *et al.* Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 2008;337:a1754.
50. Huh WK, Ault KA, Chelmow D, Davey DD, Goulart RA, Garcia FA, *et al.* Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: Interim clinical guidance. *Gynecologic Oncology.* 2015;136(2):178-82.
51. Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG Practice Bulletin Number 131: Screening for cervical cancer. *Obstet Gynecol.* 2012;120(5):1222-38.
52. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, *et al.* American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(3):147-72.
53. Huh WK, Williams E, Huang J, Bramley T, Poulos N. Cost effectiveness of human papillomavirus-16/18 genotyping in cervical cancer screening. *Appl Health Econ Health Policy.* 2015;13(1):95-107.