

DENISE ROCHA PITTA¹

ELISABETE APARECIDA CAMPOS²

LUIS OTÁVIO SARIAN³

MARCELLO SILVEIRA ROVELLA⁴

SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN⁵

Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical

Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions

Artigo original

Palavras-chave

Infecções por papillomavirus/epidemiologia
Neoplasia intraepitelial cervical
Reação em cadeia da polimerase/métodos
Prevalência

Keywords

Papillomavirus infections/epidemiology
Cervical intraepithelial neoplasia
Polymerase chain reaction/methods
Prevalence

Resumo

OBJETIVO: avaliar a prevalência dos HPV 16, 18, 31 e 45 em amostras de raspado cervical de mulheres com alterações celulares e/ou colposcopia sugestiva de lesão de alto grau ou lesão de baixo grau persistente submetidas à conização. **MÉTODOS:** Foram incluídas 120 mulheres. A análise histológica dos cones cervicais revelou 7 casos de cervicite, 22 de NIC1, 31 de NIC2, 54 de NIC3 e 6 carcinomas invasores. Foram analisadas as amostras de raspado cervical coletadas antes da conização para a presença do DNA-HPV por PCR com os *primers* de consenso, PGMYO9/11. As amostras positivas para DNA de HPV foram testadas para presença do HPV16, 18, 31 e 45 utilizando-se *primers* tipo específico para esses HPV. **RESULTADOS:** O DNA-HPV foi detectado em 67,5% das mulheres. O HPV 16 (40%) foi o tipo mais prevalente na maioria das lesões, seguido dos HPV 31 (13,3%), 45 (13,3%) e 18 (4,1%). Infecções múltiplas ocorreram em 15% dos casos e as infecções por outros tipos de HPV foram detectadas em 14% da amostra. **CONCLUSÕES:** as infecções pelos HPV 16 e 18 nem sempre ocorrem de maneira solitária (infecção única), estando associadas a outros tipos de HPV em diversas ocasiões.

Abstract

PURPOSE: to determine the prevalence of HPV 16, 18, 31 and 45 in cervical screening samples of women with cellular changes and/or colposcopy suggestive of persistent high grade or low grade lesion who were submitted to conization. **METHODS:** a total of 120 women were included in the study. Histological analysis of the cervical cones revealed 7 cases of cervicitis, 22 of CIN1, 31 of CIN2, 54 of CIN3, and 6 invasive carcinomas. The cervical screening samples were analyzed before conization for the presence of HPV-DNA by PCR using the consensus primers PGMYO9/11. HPV-DNA-positive samples were tested for the presence of HPV16, 18, 31 and 45 using type-specific primers for these HPV. **RESULTS:** HPV-DNA was detected in 67.5% of the studied women. HPV 16 (40%) was the most prevalent type in most lesions, followed by HPV 31 (13.3%), 45 (13.3%), and 18 (4.1%). Multiple infections occurred in 15% of the cases and infections with other HPV types were detected in 14% of the sample. **CONCLUSIONS:** HPV 16 and 18 infections do not always occur as a single infection, and may be associated with other HPV types on different occasions.

Correspondência:

Sophie Françoise Mauricette Derchain
Rua Dr. Antônio Hossri, 629
CEP 13083-370 – Campinas (SP), Brasil
Fone/Fax: (19) 3521-9305
E-mail: derchain@fcm.unicamp.br

Recebido

22/12/09

Aceito com modificações

29/6/10

Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil; Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas – CAISM – Campinas (SP), Brasil.

¹ Bióloga do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Seção de Laboratórios Clínicos Especializados do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

² Bióloga da Seção de Laboratórios Clínicos Especializados do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

³ Professor Assistente do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁴ Residente em Radiologia da Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁵ Professora Associada do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

Financiamento: Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), projeto 781/07.

Introdução

O câncer de colo uterino é o segundo mais frequente em mulheres no mundo, com maior prevalência nos países em desenvolvimento. Estima-se que, no Brasil, para o ano de 2010 a taxa de incidência seja de aproximadamente 18 casos por 100 mil mulheres¹. Estudos epidemiológicos e moleculares têm demonstrado que a infecção com alguns tipos de papilomavirus humano (HPV) seja o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e câncer²⁻⁴.

A relação do HPV com a carcinogênese depende fundamentalmente do tipo viral (alto ou baixo risco oncogênico), carga viral, e de sua persistência e integração com a célula hospedeira⁵. Embora a prevalência dos tipos de alto potencial oncogênico, 16 e 18, seja semelhante na maioria das populações humanas ao redor do planeta, os HPV 31, 33, 45, 52 e 58, cujo potencial oncogênico também é elevado, costumam ser encontrados em frequências variáveis, a depender da população estudada⁶⁻⁸. Essa distribuição geográfica e populacional tem relação direta com a eficácia, por exemplo, de programas de prevenção primária da neoplasia do colo, pois as vacinas profiláticas atuais têm cobertura limitada aos tipos 16 e 18. Embora tenha sido confirmada uma eficácia de quase 100% com vacinas *virus-like particle* (VLP) contra o epítipo L1 dos HPV 16 e 18, essas vacinas oferecem pouca ou nenhuma proteção contra os outros tipos de HPV, mesmo os filogeneticamente relacionados. Encontrou-se apenas uma proteção cruzada muito boa para HPV 45 e apenas parcial para HPV 31⁹. Quanto maior for a prevalência de tipos não cobertos em uma dada população, menor será a eficácia da vacinação na prevenção das lesões.

Vários protocolos de estudo vêm propondo o uso de técnicas que permitem a detecção de infecção por HPV-HR em circunstâncias que incluem o rastreamento do câncer de colo de útero e o seguimento de mulheres submetidas a tratamentos de lesões pré-invasoras. Entre os métodos de laboratório atualmente disponíveis para detecção do HPV está a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que é capaz de detectar HPV de alto e baixo risco oncogênico com *primers* de consenso ou *primers* tipo-específico¹⁰. Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a prevalência dos HPV 16, 18, 31 e 45 em amostras de mulheres submetidas à conização (CO) por resultado alterado da colpocitologia oncológica, de forma a estimar, numa população tratada em um centro de referência do sistema público de saúde, a proporção de casos que efetivamente teriam sido evitados se um programa amplo de vacinação, com as técnicas atualmente disponíveis, estivesse em vigência.

Métodos

Seleção das mulheres

Foram incluídas 120 mulheres atendidas no ambulatório de Patologia Cervical do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), encaminhadas para conização por resultado da colpocitologia oncológica com alterações celulares e/ou colposcopia sugestivas de lesão de alto grau ou lesão de baixo grau persistente. Após a anamnese, os objetivos do estudo eram apresentados às mulheres, tendo sido incluídas apenas aquelas que aceitaram participar e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídas do estudo mulheres previamente tratadas por patologia cervical induzida por HPV, em uso de medicação vaginal nos três dias anteriores à consulta, grávidas ou puérperas com menos de 42 dias após parto, ou submetidas à histerectomia. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Coleta de material

A coleta do material endocervical para o teste do HPV foi realizada durante a consulta médica citada acima, após o exame dos genitais externos e introdução do espéculo, e antes da avaliação colposcópica da cérvix. A coleta do material foi realizada com escova endocervical e o armazenamento foi feito em tubo de coleta contendo Universal Collection Medium (UCM, Qiagen do Brasil). Em seguida, era dada continuidade à rotina médica, sendo então realizadas colposcopia e conização cervical.

Detecção e genotipagem do HPV

Extração do DNA

As amostras foram coletadas e armazenadas no Universal Collection Medium (UCM/Digene do Brasil Ltda). Uma alíquota de 200 µL foi removida e centrifugada a 13.000x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* celular foi armazenado a -20°C. Para extração do DNA, as células foram suspensas novamente em 200 µL da solução de digestão (1 mM Tris, 200 µg/mL de Proteinase K, 0,5% SDS) por agitação e incubadas a 55°C por 2 horas e a 95°C por 5 minutos. Após a adição de 200 µL de solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), o tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 5000x g por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e transferida para outro tubo ao qual foi acrescentado Na AC (Acetato de sódio) 3M com pH 5,2 na proporção 1/10. Foi adicionado etanol 70% no volume de 2,5 vezes do conteúdo do tubo. Após agitação, a solução foi centrifugada a 15.000x g por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de

DNA, após evaporação total do etanol, foi ressuscitado em 100 µL da solução de TE (1 mM Tris, 100 µM Edta, pH 8,2). O DNA foi estocado a -20°C. Para controle da extração do DNA, foi amplificado um fragmento de 268 pb do gene da β-globina humana.

■ Detecção do DNA-HPV

A presença do DNA-HPV foi detectada com o uso dos *primers* de consenso PGMY09/11 que produzem um fragmento de 450 pares de base e amplifica cerca de 40 tipos virais¹¹. A reação de PCR consistiu em 45 µL da mistura de reagentes contendo: 5 Unidades de Taq Platinum, 0,25 mM desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 10% tampão PCR, 4 mM MgCl₂, e 0,1 pmol de cada *primer* e 5 µL de DNA. Na fase inicial para desnaturação, a temperatura foi de 95°C por 9 minutos. Foram realizados 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi composto de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para ligação dos *primers* ao molde genômico e 1 minuto a 72°C para extensão do amplificado. Na fase final, manteve-se a temperatura em 72°C por 7 minutos para polimerização dos fragmentos incompletos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio 1 µg/mL para análise.

■ Amplificação do DNA-HPV com primers tipo específico

A presença dos HPV 16, 18, 31 e 45 nas amostras positivas para os *primers* de consenso PGMY09/11 foi determinada em reações de amplificação (PCR) em separado, utilizando-se os *primers* específicos¹² para cada tipo de HPV (Quadro 1). Para a reação de amplificação do DNA (PCR), foram elaboradas misturas de reagentes de 45 µL contendo: 5 Unidades de Taq platinum, 0,25 mM desoxinucleotídeo (dNTPs), 10% tampão, 4 mM MgCl₂, e 0,2 pmol de cada *primer* e 5 µL de DNA. Com exceção da temperatura de “anelamento”, que variou para cada tipo de HPV, as demais condições da reação eram iguais. Na fase inicial para desnaturação, a temperatura foi de 95°C por 9 minutos. Foram realizados 40 ciclos de amplificação – cada ciclo incluiu: 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto da temperatura ideal de acordo com cada tipo de HPV para ligação dos *primers* ao molde genômico e 1 minuto a 72°C na extensão do amplificado. Na fase final, manteve-se a temperatura em 72°C por 7 minutos para polimerização dos fragmentos incompletos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% e corados com brometo de etídio 1 µg/mL.

Os controles positivos consistiam em amostras coletadas de pacientes não incluídas neste estudo, processadas em condições similares, com infecção por HPV com tipos virais conhecidos *a priori* (amostras testadas em estudo

Quadro 1 - Sequência dos primers tipo-específicos para cada tipo viral investigado

HPV	Sequência
16	5'- CAT TTG TTG GGG TAA CCA AC - 3' 5'- TAG GTC TGC AGA AAA CTT TTC - 3'
18	5'- TGT TTG CTG GCA TAA TCA AT- 3' 5'- TAA GTC TAA AGA AAA CTT TTC - 3'
31	5'- TAT TTG TTG GGG CAA TCA G - 3' 5'- CTA AAT CTG CAG AAA ACT TTT - 3'
45	5'- TTA ATA AGC CAT ATT GGT TAC ATA AG - 3' 5'- TTA GGT CAA CAG TCC AAA ACT TTA - 3'

anterior). Controles negativos consistiam em água livre de DNase e RNase.

■ Análise histológica dos espécimes de conização

Todos os tecidos obtidos por conização foram fixados em formalina tamponada com fosfato a 10%, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Os achados histológicos foram analisados de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹³. A análise histológica dos cones cervicais revelou 7 casos de cervicite, 22 de NIC1, 31 de NIC2, 54 de NIC3 e 6 carcinomas invasores. A análise histológica foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Resultados

A média de idade das mulheres foi 33,1 anos com variação de 18 a 67 anos (dado não apresentado em tabelas). O DNA-HPV foi detectado em 81 das 120 mulheres (67,5%). Dessas 81 amostras positivas para HPV, os HPV 16, 18, 31 ou 45 foram identificados em 64 casos (79%). Portanto, 17 (21%) das mulheres nas quais o DNA-HPV foi detectado pelo PGMY09/11 apresentam infecção por outros tipos de HPV não incluídos no estudo. O HPV 16 esteve presente em 48 (40%) das 120 amostras. O HPV 31 esteve presente em 16 casos (13,3%), o HPV 45 em 16 (13,3%), e o HPV 18 em 5 (4,1%) (Tabela 1).

Na Tabela 2, apresentamos a distribuição dos HPV segundo a gravidade da lesão cervical. Apenas duas das sete mulheres com cervicite e duas das 22 mulheres com NIC1 apresentaram infecção pelos HPV 16, 18, 31 ou 45. O HPV 16 isoladamente e/ou associado ao 31 e ao 45 foi o mais presente nas NIC2 e 3. Entre os carcinomas

Tabela 1 - Prevalência total de HPV detectados nos raspados da cérvix uterina (infecção simples ou múltipla)

Tipo de HPV	n	%
16	48	40
18	5	4,1
31	16	13,3
45	16	13,3
Outros	17	14,1

Tabela 2 - Tipos de HPV detectados nos raspados da cérvix uterina de acordo com o diagnóstico histológico na peça de conização

HPV	Cervicite	NIC 1	NIC 2	NIC 3	Carcinoma invasor	Total n (%)
Negativo	4	14	9	11	1	39 (32,5)
Positivo	3	8	22	43	5	81 (67,5)
16	2	-	10	18	1	31
16+18	-	-	-	1	-	1
16+31 e/ou 45	-	-	5	8	1	14
16+18+31 e/ou 45	-	-	-	2	-	2
18	-	-	1	-	-	1
18+45	-	1	-	-	-	1
31 e/ou 45	-	1	4	6	3	14
Outros tipos	1	6	2	8	0	17
Total	7	22	31	54	6	120

Tabela 3 - Proporção de casos infectados pelo HPV 16 e/ou 18 e por outros tipos segundo a gravidade da lesão histológica

Tipos de HPV	Tipos histológicos		
	NIC2 + n (%)	NIC3 + n (%)	Carcinoma invasor n (%)
HPV 16 e/ou 18	31 (35)	20 (34)	1 (17)
HPV 16 e/ou 18 e outros	16 (17)	11 (18)	1 (17)
Outros HPV além de 16 e 18	23 (25)	17 (28)	3 (50)
Negativos para HPV	21 (23)	12 (20)	2 (26)
Total de casos	91 (100)	60 (100)	6 (100)

NIC2+: Neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave; NIC3+: Neoplasia intraepitelial cervical grau 3 ou mais grave.

invasores, nenhum esteve associado ao HPV 18; 2 casos apresentaram infecção pelo HPV 16 isolada ou associada ao HPV 31 e/ou 45, e 3 casos com infecção pelo HPV 31 e/ou 45.

As infecções pelos tipos 16 e/ou 18 em associação a outros tipos de HPV estão demonstradas na Tabela 3. Dentre os casos de lesões NIC2 ou mais grave, aproximadamente metade apresentava infecção por HPV 16 e 18, sozinhos ou combinados com outros vírus de alto potencial oncogênico. Praticamente a mesma proporção de casos de NIC3 ou pior encontrava-se nesta situação. Dentre os casos de câncer, apenas 2 em 6 (33%) apresentavam, no momento do teste, infecção pelos HPV 16 ou 18 nos raspados cervicais.

Discussão

Embora o principal fator de desenvolvimento e progressão da NIC em mulheres infectadas pelo HPV seja o estado de seu sistema imunológico, alguns tipos de HPV determinam diferentes riscos para a persistência e a progressão determinada pelo vírus. O HPV 16 é, claramente, o tipo com maior poder carcinogênico, sendo responsável por metade dos casos de câncer cervical no mundo todo. Os outros tipos são menos comuns nas populações de grandes centros urbanos⁸. As infecções não relacionadas ao tipo 16 mostraram um risco para desenvolvimento de NIC3 de aproximadamente 20% em relação ao risco

determinado pelo tipo 16¹⁴. Contudo, outros tipos menos comuns em populações de mulheres de grandes centros urbanos e em mulheres com NIC e câncer têm limitado a precisão das estimativas de risco.

No presente estudo, apenas 35% dos casos estavam infectados por HPV 16 e/ou 18 exclusivo. Dos 91 casos de NIC2 ou mais grave, 39 estavam infectados por outros tipos de HPV ou por HPV 16 e/ou 18 associados a outros tipos de reconhecido potencial oncogênico. Pode-se considerar que, provavelmente, apenas um terço dos casos NIC2 ou mais teriam sido efetivamente evitados pelas vacinas atualmente disponíveis, desconsiderando que, na supressão populacional dos tipos 16 e 18, os demais tipos oncogênicos possam ocupar o espaço epidemiológico deixado.

Nosso estudo confirma o conceito de que limitar a avaliação de risco a poucos tipos do HPV pode não ser adequado diante da realidade microbiológica associada a este vírus. Em nossa casuística, menos de metade dos casos de NIC2 ou mais tinham infecção limitada aos HPV 16 e 18. Os casos considerados negativos para HPV pelo *primer* PGM9/11, dada a evidência epidemiológica, provavelmente desenvolveram a doença na presença de um dos vírus, que teria sido eliminado pelo sistema imune. Vale ressaltar, contudo, que esta hipótese é menos plausível justamente para os HPV 16 e 18, que são reconhecidamente estáveis na cérvix uterina por disporem de mecanismos adaptativos bem desenvolvidos contra o sistema imune humano. Outras explicações seriam a coleta ter sido inadequada (i.e. amostras usadas para PCR não eram representativas da lesão) e falso-negativos da PCR, visto que o diagnóstico da infecção é baseado na informação genética do vírus na amostra celular coletada do sítio da infecção¹⁵.

Na meta-análise realizada por Smith et al.⁸, 70% dos casos de carcinoma cervical invasivo estavam associados com infecção pelo HPV 16 (55%) ou 18 (15%), essa proporção de HPV 16/18 é geograficamente diferente, sendo maior na Europa, América do Norte e Oceania do que na África, Ásia e Américas do Sul e Central. Os

outros tipos mais comuns eram HPV 31, 33, 35, 45, 52 e 58, que são os encontrados em todos os continentes. Por outro lado, nas lesões intraepiteliais de alto grau, a prevalência combinada do HPV 16/18 era de 52%. Os outros tipos mais comuns nas lesões de alto grau eram grandemente similares àqueles encontrados no carcinoma cervical, exceto pela posição do HPV 45. Apesar de o HPV 16 ser o tipo mais comumente encontrado nos estudos, a presença de coinfeções com outros genótipos de alto risco são frequentes. O HPV 18 é também um tipo comum, a prevalência e incidência da infecção pelo tipo 18 varia mais entre as populações e outros tipos são mais frequentemente prevalentes¹⁶. Nosso estudo contrasta em parte com estes dados da literatura, porquanto a presença de HPV 45 em nossa amostra foi de 13%, semelhante àquela do HPV 31.

Em nosso estudo, as infecções múltiplas dos HPV 16 e/ou 18 associadas aos HPV 31 e/ou 45 foram observadas em 17 casos. A proporção estimada de doença cervical atribuída aos HPV tipos 16 e 18 é complicada pela ocorrência comum de infecções com múltiplos genótipos, que pode variar dependendo da população estudada¹⁷. A precisa relação entre os múltiplos tipos de HPV da infecção na contribuição do desenvolvimento da lesão não está bem elucidada. De um lado, pode-se pensar que cada tipo individualmente tem a

capacidade de promover o desenvolvimento da lesão e, conseqüentemente, a prevenção de todos os tipos presentes seria necessária para prevenir a lesão. Em outro extremo, cada tipo seria individualmente necessário para o desenvolvimento da lesão e, portanto, a prevenção de um único tipo de HPV poderia evitar a lesão¹⁸. Trottier et al.¹⁹ avaliaram a duração média das infecções simples e por múltiplos tipos entre 2.462 mulheres brasileiras que participaram da coorte Ludwig-McGill. Nas infecções só com HPV 16, esse tempo era de 11 meses; quando associada a ≥ 1 tipo de HPV, era de 15,4 meses. Por outro lado, para o HPV 58, esse tempo era de 6,6 meses para infecção única e 17,2 para infecção múltipla.

Em síntese, este estudo indica, confirmando dados encontrados em outras populações, que as infecções pelos HPV 16 e 18 nem sempre ocorrem de maneira solitária (infecção única), estando associadas a outros tipos de HPV em muitos casos. Ainda vale ressaltar que inúmeros casos de NIC2 ou mais grave foram encontrados entre mulheres que, ao menos no momento do teste, não apresentavam infecção pelos HPV 16 e 18. Esses dados têm implicações clínicas quando se considera a efetividade na prevenção da NIC das atuais vacinas profiláticas para HPV, dado que sua cobertura, em relação aos HPV de alto risco oncogênico, é restrita aos tipos 16 e 18.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009 [citado 2009 Dez 10]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>
2. Sima N, Wang S, Wang W, Kong D, Xu Q, Tian X, et al. Antisense targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes contributes to apoptosis and senescence in SiHa cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol*. 2007;106(2):299-304.
3. Bosch FX, de Sanjosé S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):3-13.
4. Muñoz N, Bosch XF, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
5. Manavi M, Hudelist G, Fink-Retter A, Gschwantler-Kaulich D, Pischinger K, Czerwenka K. Human papillomavirus DNA integration and messenger RNA transcription in cervical low- and high-risk squamous intraepithelial lesions in Austrian women. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(2):285-94.
6. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1157-64.
7. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(7):453-9.
8. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.
9. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006;367(9518):1247-55.
10. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:26-34.
11. Graviitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357-61.
12. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV Type. *J Clin Microbiol*. 1999;37(4):1030-4.
13. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ. Histological typing of female genital tract tumours [WHO International Histological Classification of Tumours, 13]. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
14. Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE; Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical precancer. *J Infect Dis*. 2006;194(9):1291-9.

15. Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*. 2007;111(1):1-14.
16. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S1-15.
17. Massad LS, Einstein M, Myers E, Wheeler CM, Wentzensen N, Solomon D. The impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer prevention efforts. *Gynecol Oncol*. 2009;114(2):360-4.
18. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(7):1611-22.
19. Trottier H, Mahmud S, Prado JC, Sobrinho JS, Costa MC, Rohan TE, et al. Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination. *J Infect Dis*. 2008;197(10):1436-47.