

ORIGINAL BREVE

Recibido: 8 de septiembre de 2016

Aceptado: 16 de enero de 2017

Publicado: 9 de febrero de 2017

INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA PREVALENCIA DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO EN MUJERES CON LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO EN LA COMUNIDAD NAVARRA

María del Rosario Mercado Gutiérrez (1), Carolina Arean Cuns (1), María Luisa Gómez Dorronsoro (1), Irene Paniello Alastruey (2), Fermin Mallor Giménez (2) María Dolores Lozano Escario (3) Mercedes Santamaría Martínez (1).

- (1) Servicio Anatomía Patológica. Complejo Hospitalario de Navarra. Navarra. España.
- (2) Departamento de Estadística. Universidad Pública de Navarra. Navarra. España.
- (3) Servicio Anatomía Patológica. Clínica Universidad de Navarra. Navarra. España.

RESUMEN

Fundamento: El cáncer de cuello uterino (CCU) es la segunda causa de muerte en España en mujeres entre 15 y 44 años. Esta ligado íntimamente a la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR). La prevalencia del VPH-AR incrementa según la gravedad de la lesión, grupo etario y región geográfica cuyo conocimiento es esencial para el desarrollo de estrategias de prevención. El objetivo fue determinar la influencia de la edad de las mujeres (menores o mayores de 35 años) en relación con la especie de VPH-AR presente y la lesión escamosa intraepitelial (LEI).

Material: Estudio observacional transversal de las citologías líquidas ginecológicas con LEI recibidas en el Hospital de Navarra entre 2010 y 2014 (67.935). A todas ellas se les realizó la detección del VPH-AR (Cervista®-Hologic). Las mujeres se clasificaron en menores de 35 e igual o mayores de 35 años. Se estimó la proporción e intervalo de confianza al 95% (IC95%).

Resultados: La prevalencia de VPH-AR fue del 59,7%, el 64,6% en mujeres menores de 35 años. Las especies de VPH-AR alfa 9 del subtipo 16 (VPH-AR 16) y alfa 5 del subtipo 51 (VPH-AR 51) fueron los más frecuentes (60,9% y 51,7%). En las mujeres mayores de 35 años la prevalencia de lesiones escamosas de alto grado (H-SIL) fue 6,5 % y en las de menor edad 3,7%. El 88,8% de las H-SIL estaban asociadas a VPH-AR 16. La presencia de VPH-AR 16 quintuplica la probabilidad de H-SIL frente a LEI de bajo grado independientemente de la edad.

Conclusiones: El VPH-AR 16 se asoció a H-SIL mientras que las especies de VPH-AR alfa 7 del subtipo 18 y VPH-AR 51 se asociaron a LEI de bajo grado independientemente de la edad. La alta prevalencia de VPH-AR en la Comunidad de Navarra puede ser relevante en la futura planificación de las estrategias de vacunación en nuestro entorno.

Palabras Clave: Neoplasia intraepitelial cervical, VPH, Pruebas de ADN del Papilomavirus Humano, Papilomavirus Humano 31, Papilomavirus Humano 16, Células Escamosas Atípicas del Cuello del Útero, Enfermedades del Cuello del Útero, Vacunas contra Papilomavirus.

Correspondencia

María del Rosario Mercado Gutiérrez
Servicio Anatomía Patológica "A"
Complejo Hospitalario de Navarra
Calle Iruñlarrea, 3
31008 Pamplona
Navarra
España
mr.mercado.gutierrez@navarra.es
mdrmg80@hotmail.com

ABSTRACT

Influence of Age in the Prevalence of High-Risk Human Papilloma Virus in Women with Pre-Neoplastic Cervical Lesions in Navarra, Spain

Background: Cervical carcinoma (CC) is the second cause of death among women aged 15 and 44 in Spain. CC is linked to high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection and its prevalence varies according age and geographical region. The awareness of the latter is essential for public health prevention efforts. The aim was to study the age related in HR-HPV genotypes in cytologies with squamous intraepithelial lesion (SIL).

Methods: From a total of 67,935 gynecologic cytologies over a four-year period, we selected cytologic specimens with SIL. We used the Cervista® test to detect HR-HPV DNA. Women were classified into two groups under 35 and over 35 years old. Proportions were estimated with confidence intervals at 95% (95% CI).

Results: HR-HPV prevalence was 59,7%; 64,6% in women under 35 years old. HR-HPV species alpha 9 type 16 (HR-HPV 16) and alpha 5 type 51 (HR-HPV 51) were the most prevalent (60,9% and 51,7%). High-grade squamous intraepithelial lesions (H-SIL) were twice as high in women under 35 years (6,5 vs. 3,7%). 88,8% of H-SIL was associated HR-HPV 16, which increases the probability of H-SIL against Low-grade squamous intraepithelial lesions (L-SIL) regardless of age.

Conclusions: In our population HR-HPV 16 was associated to H-SIL whereas HR-HPV specie alpha 7 type 18 and HR-HPV 51 to L-SIL regardless of age. The high prevalence of HR-HPV 51 in Navarra's population (51,7%), suggests that local vaccination programs be re-assessed.

Key words: Cervical intraepithelial neoplasia, Human Papillomavirus DNA Tests, Human papillomavirus 31, Human papillomavirus 16, Atypical Squamous Cells of the Cervix, Uterine Cervical Diseases, Papillomavirus Vaccines.

Cita sugerida: Mercado Gutiérrez MR, Arean Cuns C, Gómez Dorronsoro ML, Paniello Alastruey I, Mallor Giménez F, Lozano Escario MD, Santamaría Martínez M. Influencia de la edad en la prevalencia de virus de papiloma humano de alto riesgo en mujeres con lesiones precursoras de cáncer de cuello uterino en la Comunidad Navarra. Rev Esp Salud Pública.2017;91: 9 de febrero e201702018.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino (CCU) es la cuarta neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial⁽¹⁾. En España se diagnostican unos 2.511 casos nuevos cada año, con una mortalidad de 848 casos anuales⁽²⁾.

Se ha establecido que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) es una causa necesaria y la principal en el desarrollo del CCU y sus lesiones precursoras⁽³⁾. Los CCU se desarrollan a partir de una lesión intraepitelial de bajo grado (L-SIL acrónimo en inglés) que incrementa de grado de forma progresiva. La mayoría de estas lesiones son pasajeras y revierten espontáneamente, pero un 10-15% progresa a lesiones intraepiteliales de alto grado (H-SIL por su acrónimo en inglés) y son estas las consideradas precursoras inmediatas de carcinoma cervical⁽⁴⁾.

Aunque la prevalencia de los tipos de VPH varía según las diferentes regiones geográficas, los subtipos VPH de alto riesgo (VPH-AR) 16 y/o 18 son los más prevalentes en el desarrollo de carcinomas infiltrantes de cuello uterino a nivel mundial (70,9%), tanto en países en vías de desarrollo como en los desarrollados⁽⁵⁾. El 20% adicional están causados por los subtipos 31, 33, 35, 45, 52 y 58 que son los responsables del 41-67% de H-SIL y del 16-32% de L-SIL. Sin embargo, cuando se trata únicamente de H-SIL, el VPH-AR 16 es el más prevalente (44,1%) a nivel mundial, seguido por el 58 (13,5%) en países en vías de desarrollo y el 31 (10,2%) en países desarrollados. Aunque el VPH 16 sigue siendo el más prevalente en L-SIL (18,5%) disminuye notablemente debido al incremento de la prevalencia de otros subtipos como el 58 y el 18 en países en vías de desarrollo (14,4%) y el 51 y el 31 en países desarrollados (17%)^(6,7).

En los primeros años de la vida sexual se observa una elevada incidencia de infección por VPH transitoria, al contrario que en las mujeres mayores de 35 años, que experimentan una disminución de la prevalencia de infecciones. Sin embargo, el porcentaje de persistencia en

este grupo etario es más elevado, lo que implica un mayor riesgo de lesiones pre-neoplásicas a partir de los 35 años. Por ello, es esencial el conocimiento de la prevalencia y los subtipos de VPH-AR, sobre todo en este último grupo de mujeres^(8,9).

El conocimiento de la distribución de los VPH-AR a nivel mundial permite el desarrollo de vacunas profilácticas que pretenden disminuir el riesgo de desarrollo de CCU⁽¹⁰⁾. En la Comunidad Foral de Navarra no existen estudios de prevalencia de VPH-AR en citologías ginecológicas con patología.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la influencia de la edad en la prevalencia de VPH-AR en mujeres con distintos tipos de lesión escamosa intraepitelial (LEI) así como describir la prevalencia de los distintos grupos de VPH-AR según tipo de LEI y edad de la mujer.

SUJETOS Y MÉTODOS

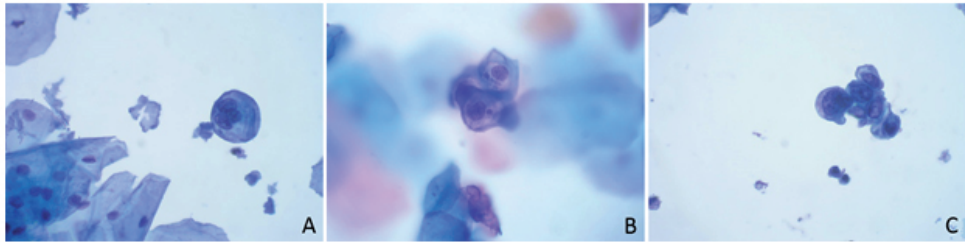
Diseño. Estudio observacional transversal realizado en el Servicio de Anatomía Patológica “A” del Complejo Hospitalario de Navarra (CHN) entre Enero de 2010 y Diciembre de 2014.

Muestra. Se estudiaron las citologías líquidas ginecológicas enviadas al CHN incluidas dentro del programa de cribado de CCU (67.935) que presentaron algún tipo de LEI (ASC-US, L-SIL o H-SIL). En todas se realizó la determinación de VPH-AR. Se excluyeron aquellas con diagnóstico de algún tipo de anomalía de células glandulares.

Las mujeres se dividieron en dos grupos de edad: menor de 35 años y mayor o igual a 35 años.

La citología ginecológica se obtuvo mediante toma exocervical-endocervical con cepillo, fijada en medio líquido con PreservCyt (Hologic), procesada mediante ThinPrep5000 (Hologic) y teñida con la tinción de Papanicolaou modificada.

Figura 1
Sistema de Bethesda para gradación de lesión escamosa intraepitelial en citología



Las LEI se clasificaron según el sistema de Bethesda 2001⁽¹¹⁾ (figura 1).

La detección de VPH-AR se realizó a partir de 2 ml de muestra líquida mediante el método Cervista® (Hologic), técnica automatizada basada en hibridación que detecta secuencias de ADN correspondientes a 14 tipos de VPH-AR y las amplifica enzimáticamente generando una señal fluorescente. El resultado es cualitativo y agrupa los 14 subtipos en tres especies según sus relaciones filogenéticas: Alfa 5 del VPH-AR subtipo 51 (VPH-AR 51): 51, 56, 66; alfa 7 del VPH-AR subtipo 18 (VPH-AR 18): 18, 39, 45, 59, 68 y alfa 9 del VPH-AR subtipo 16 (VPH-AR 16): 16, 31, 33, 35, 52 y 58⁽¹²⁾.

Análisis estadístico. La edad, que seguía una distribución normal, se describió como media, mínimo y máximo, mientras que las variables cualitativas se describieron como frecuencia y porcentaje. En el caso de la prevalencia de VPH-AR y de los distintos tipos de LEI se realizó la estimación de la proporción y su intervalo de confianza al 95% (IC95%). La asociación entre los distintos tipos de LEI, la positividad para VPH-AR o sus familias presentes y el grupo de edad, se estudiaron mediante tablas de contingencia χ^2 .

Cuando esta asociación resultó relevante, se cuantificó mediante el cálculo de la OR de prevalencia (POR) o la diferencia de proporciones (DP) y sus correspondientes IC95% mediante una macro en SPSS⁽¹³⁾. Los análisis se realizaron con SPSS 22 y MINITAB 17.

Este estudio contó con la aprobación expresa del comité local de ética y de ensayos clínicos.

RESULTADOS

La muestra seleccionada fue de 3.951 citologías, de las que excluyeron 24 con diagnóstico de células glandulares atípicas o adenocarcinoma, 2 correspondientes a mujeres con edades de 4 y 94 años, y 20 citologías en las que no se pudo determinar la presencia de VPH-AR por motivos técnicos. Por tanto, las citologías ginecológicas finalmente estudiadas fueron 3.905.

La edad estuvo comprendida entre los 14 y los 85 años, con una media de 32,8 (desviación estándar de 10,6 años). El 38,7% de las mujeres tenían 35 años o más.

Se detectó presencia de VPH-AR en 2.332 casos, por lo que se estimó una prevalencia en las citologías con LEI del 59,7% (IC 95%: 58,2-61,3). Las mujeres menores de 35 años tuvieron una positividad para VPH-AR del 64,6% y las de mayor edad del 52,1% (POR=1,68; IC 95%: 1,47-1,91; $p<0,001$).

En la población estudiada se detectaron altas frecuencias de L-SIL (52,8%; IC 95%: 51,4-54,) y de ASC-US (42,3%; IC 95%: 40,7-43,8), mientras que las H-SIL tuvieron una frecuencia del 4,8% (IC 95%: 4,1-5,4).

Aunque la tendencia global se mantuvo según el grupo de edad, en las citologías del grupo de mayor edad se observó un 3,7% me-

Tabla 1
Prevalencia general y por grupo de edad de VPH-AR según el tipo de lesión escamosa intraepitelial

Lesión escamosa intraepitelial	General n (%)	Edad en años n (%)	
		< 35	> 35
ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado	706 (42,7)	469 (48,0)	237 (35,2)
L-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado	1.456 (70,5)	990 (74,9)	464 (62,9)
H-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado	170 (90,9)	84 (94,4)	86 (87,8)

Tabla 2
Prevalencia de especie de virus de papiloma humano de alto riesgo según el tipo de lesión escamosa intraepitelial, general y por edad

ESPECIE VPH-AR	General n (%)			Edad en años n (%)					
				< 35			> 35		
	ASC-US	L-SIL	H-SIL	ASC-US	L-SIL	H-SIL	ASC-US	L-SIL	H-SIL
Alfa 9 (VPH-AR 16)	452 (64,09)	891 (61,2)	150 (88,8)	302 (64,4)	604 (61,0)	77 (92,8)	150 (63,3)	285 (61,4)	73 (84,9)
Alfa 5 (VPH-AR 51)	317 (44,9)	746 (51,2)	42 (24,9)	211 (45,0)	507 (51,2)	20 (24,1)	106 (44,7)	239 (51,5)	22 (25,6)
Alfa 7 (VPH-AR 18)	211 (29,9)	413 (28,4)	23 (13,6)	143 (30,5)	292 (29,5)	9 (10,8)	68 (28,7)	121 (26,1)	14 (16,3)

*VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo. ** LEI: Lesión escamosa intraepitelial. ^aASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado. ^bL-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado. ^cH-SIL: Lesión escamosa intraepitelial de alto grado

nos de ASCUS y un 6,5% menos de L-SIL, mientras que la frecuencia de H-SIL casi se duplicó (3,7 vs 6,5%; POR=1,8; IC 95%: 1,3-2,4; p<0.001).

La distribución de lesiones se relacionó con la presencia de VPH-AR (p<0,001). En las citologías positivas para VPH-AR la frecuencia de L-SIL se multiplicó por 1,6 (62,4 vs 38,7%) y las de H-SIL por 6,6 (7,3 vs 1,1%), mientras que hubo la mitad de ASC-US que en las citologías negativas (30,3 vs 60,3%).

La prevalencia de VPH-AR se incrementó al aumentar el grado de la lesión observada en la citología (tabla 1). Esta misma tendencia se observó independientemente de la edad de las mujeres, aunque en las menores de 35 años la prevalencia fue mayor tanto en ASC-US (DP=12,8; IC 95%: 8,0-17,6) como en L-SIL (DP=12,0%; IC 95%: 7,8-16,2) (p<0,001). No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de VPH-AR en

H-SIL según la edad (94,4 vs 87,8%; DP=6,6; IC 95%: 1,9-15,2; p=0,187).

El 66,5 % de las infecciones fueron debidas a la presencia de virus de una única especie y el resto fueron infecciones múltiples por dos (25,0%) y tres especies de virus (8,5%). La edad no influyó en el tipo de infección.

Los virus más prevalentes fueron los VPH-AR 16 (60,9%) y 51 (51,7%), mientras que los VPH-AR 18 tuvieron una frecuencia del 29,3%. Esta misma tendencia se apreció en las infecciones únicas y dobles, si bien la prevalencia de las especies alpha 9 (VPH-AR 16), alpha 5 (VPH-AR 51) y alpha 7 (VPH-AR 18) fue doble en infecciones múltiples (83,5%; 75,9% y 40,6% respectivamente) que en únicas (47,5%; 36,5% y 16,0% respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en estos porcentajes según los grupos de edad considerados.

Las infecciones por los VPH-AR 16 fueron significativamente más frecuentes en H-SIL que en ASC-US o L-SIL, mientras que las prevalencias de las especies VPH-AR 51 y 18 fueron significativamente menores en H-SIL (tabla 2). Esta tendencia se mantuvo en ambos grupos de edad. Considerando únicamente las LEI de alto y bajo grado, la infección por la especie VPH-AR 16 se asoció con H-SIL (POR=5,0; IC 95%: 3,1-8,2; $p<0,001$) mientras que la infección por VPH-AR 51 y 18 se asoció a L-SIL (POR=3,2; IC 95%: 2,2-4,6; $p<0,001$ y POR=2,5; IC 95%: 1,6-4,0; $p<0,001$ respectivamente).

DISCUSIÓN

En nuestra serie se observa una alta prevalencia de VPH-AR en LEIs (59,7%), superior en mujeres menores de 35 años respecto al grupo de más edad. De Oña y col⁽¹⁴⁾ reportaron tasas ligeramente inferiores de VPH-AR a las nuestras en citologías patológicas en el norte de España. Mientras que otros estudios mostraron este incremento de la prevalencia en mujeres jóvenes también en citologías no patológicas^(15,16), como el caso del metanálisis de Bruni y col.⁽¹⁷⁾ en el que alcanzaba incluso hasta el 50% en menores de 35 años.

A partir de los 35 años la prevalencia se mantiene estable en unos valores próximos al 5%⁽¹⁸⁾. Sin embargo el porcentaje de persistencia en este grupo etario es más elevado, lo que implica un mayor riesgo de lesiones pre-neoplásicas a partir de esta edad⁽¹⁹⁾. Es por ello que durante la última década se han incorporado como recomendaciones en el cribado de CCU las pruebas de detección de VPH-AR, especialmente en mujeres mayores de 30 años y en aquellas con citologías anormales⁽²⁰⁾.

Cuando relacionamos la edad con el tipo de lesión se encuentra que el porcentaje de mujeres con L-SIL y ASC-US es mayor entre las menores de 35 años, lo contrario a lo que ocurre con H-SIL, que casi se duplica en las mujeres de mayor edad. Esto coincide con los hallazgos de estudios previos en los que

se encuentran tasas de regresión superiores de H-SIL en mujeres jóvenes (desde el 60 al 92%) que en mayores de 35 años (alrededor 15%)⁽²¹⁾ mientras que la incidencia de H-SIL (CIN3) y cáncer aumenta en estas últimas edades⁽²²⁾.

En nuestro estudio hubo asociación estadísticamente significativa entre el incremento del porcentaje de la infección de VPH-AR y el grado de LEI con independencia de la edad, siendo hasta siete veces mayor en los casos de H-SIL, lo que refrenda la fuerte asociación de la infección por VPH con la progresión y desarrollo del CCU^(3,8). Otras investigaciones de prevalencia realizadas en mujeres con citologías anómalas también observan que el porcentaje de infección por VPH-AR en mujeres con H-SIL es casi el doble que con L-SIL (85,5% frente a 47,4%)⁽²³⁾.

Otro dato de nuestros resultados a resaltar es que los VPH-AR 16 fueron los más frecuentes seguidos por los VPH-AR 51, mientras que los VPH-AR 18 tuvieron menor presencia, resultados equiparables a los encontrados en otros estudios realizados en España en los que el VPH-AR 16 se identificó en el 60% de infecciones simples y en el casi el 70% de infecciones múltiples⁽⁶⁾.

Como vemos, la prevalencia de infección por VPH-AR se duplica cuando comparamos infecciones únicas con múltiples independientemente de la edad, por lo que se esperaría un mayor riesgo de desarrollo de CCU en estas citologías debido al mayor tiempo de persistencia del VPH en las infecciones múltiples. Sin embargo en el estudio de seguimiento de Plummer y col.⁽²⁴⁾ en este último tipo de infecciones concluye que el riesgo de CCU respecto a la presencia de múltiples infecciones no influye en el curso de la enfermedad, debido a que cada tipo de virus actúa de manera independiente a los demás.

Encontramos tasas superiores de infecciones múltiples comparados con estudios similares realizados en otras comunidades (entre 5% y 30%)⁽²⁵⁾, sin embargo la frecuencia de

H-SILs no es mayor. Tanto en nuestro trabajo como en los de otros autores⁽⁶⁾, los VPH-AR de la familia 16 fueron los más frecuentes en este tipo de infecciones, lo que apoyaría lo descrito por Plummer y col.⁽²⁴⁾ que asocia el CCU al tipo de VPH-AR y no al porcentaje de infecciones.

Al igual que en el resto de estudios poblacionales a nivel mundial^(5,7,26), en nuestra serie se observa que las H-SIL se asocian fundamentalmente a VPH-AR 16 (88,8%). Este porcentaje es ligeramente superior al encontrado en otras regiones geográficas como en Estados Unidos donde Isinga y col.⁽²⁷⁾ encontraron que alrededor del 60% de H-SIL eran causados por VPH-AR de los subtipos 16/31 y casi el 80% de los CCU por los subtipos 16/18. En España, Alemany y col.⁽⁶⁾ reportaron una prevalencia del 72,4% de H-SIL VPH-AR positivos teniendo en cuenta los subtipos 16 y 18.

Cabe destacar que en nuestra investigación el VPH-AR 51 está presente en el 51,7% de todas las LEI. Este dato puede ser relevante en la futura planificación de las estrategias de la vacunación en nuestro entorno, ya que los programas de inmunización actuales cubren únicamente los subtipos 16 y 18, que son los VPH-AR más prevalentes a nivel mundial^(10,14,28), por lo que la efectividad variaría según la región geográfica⁽⁴⁾.

Uno de los resultados más interesantes de nuestro trabajo es que hemos conseguido medir la probabilidad de desarrollar un L-SIL frente a H-SIL según la especie de VPH-AR. Así la probabilidad de tener un L-SIL frente a un H-SIL es tres veces mayor en presencia de VPH-AR 51 y casi el doble en presencia de VPH-AR 18. Al contrario que para VPH-AR 16, con el que la probabilidad de desarrollar un H-SIL frente a L-SIL es 2,5 mayor. Estos resultados podrían ser muy útiles de tener en cuenta en los programas de cribado, ya que una de las limitaciones de los test de VPH es que son muy sensibles pero poco específicos para detectar LEI⁽²²⁾, por lo que se requiere la repetición de la prueba a los 6-12 meses. Ante la presencia de infección por VPH-AR 16, 18

o 51 la repetición de la prueba se podría acortar o prolongar según el tipo de virus⁽²⁹⁾.

Las limitaciones del estudio se relacionan con el test de Cervista, que no permite un genotipado aislado de los VPH-AR 16 y 18 frente a los otros tipos filogenéticos de su misma especie. A su vez, los test de detección de VPH detectan un número elevado de mujeres con infecciones sin significado clínicamente relevante o mujeres con infección latente, cuya evolución se desconoce y probablemente se resuelva de manera espontánea por lo que, con el fin de diferenciar la infección transitoria de la persistente y de identificar las células infectadas por VPH en proceso de transformación neoplásica, se están investigando nuevos biomarcadores que incrementen el valor predictivo positivo para H-SIL y CCU, en particular el estudio de la proteína p16INK4a^(30,31).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11
2. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gómez D, et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 15 December 2016. (Citado el 15-01-2017) Disponible en: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
3. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2013;382:889-99.
4. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014;383:524-32.
5. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206:46.e1-e11.
6. Alemany L, Perez C, Tous S, Llobart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, et al. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol*. 2012;124:512-7.

7. 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;11:1048-56.
8. Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol.* 2007;212:356-67.
9. Williams VM, Filippova M, Soto U and Duerksen-Hughes P. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011;6(1):45-57.
10. Markowitz LE, Tsu V, Deeks SL, Cubie H, Wang SA, Vicari AS, Brotherton JM. Human papillomavirus vaccine introduction—the first five years. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:139-48
11. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.*2002;287:2114-19
12. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, and zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17-27.
13. Schiaffino A, Rodriguez M, Pasarín MI, Regidor E, Borrell C. et al. Odds ratio or prevalence ratio? Their use in cross-sectional studies. *Gac Sanit.* 2003;17:70-4.
14. De Oña M, Alvarez-Argüelles ME, Torrents M, Villa L, Rodríguez-Feijoo A, Palacio A, et al. Prevalence, evolution, and features of infection with human papillomavirus: a 15-year longitudinal study of routine screening of a women population in the north of Spain. *J Med Virol.* 2010;82:597–604.
15. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, Vidart JA, Kjaer SK, Bosch FX, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol.* 2012 Jun;84:947-56.
16. 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;7:453-9.
17. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99.
18. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* 2000;151:1158-71.
19. 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;13:78-88.
20. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenk U, Segnan N, et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition-summary document. *Ann Oncol.* 2010;21:448-58.
21. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, et al. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* 2010;116:1373-80.
22. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney S, Gage JC, Castle PE. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103: 368–383.
23. Gonzalez-Bosquet E, Almagro MM, Mora I, Suñol M, Callejo J, Laila JM. Prevalence of human papilloma virus infection of the uterine cervix in women with abnormal cervical cytology. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006;27:135-8.
24. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis or atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007;195:1582–89.
25. García-García JA, Pérez-Vallés A, Martorell M, Gómez B, Gómez-Cabrero D, Soler F, et al. Distribution of human papillomavirus types in women from Valencia, Spain, with abnormal cytology. *Acta Cytol.* 2010 ;54:159-64.
26. Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJ, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *Int J Cancer.* 2011;128:927-35.
27. 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;17:1611-22.

28. Lévy-Bruhl D, Bousquet V, King LA, O'Flanagan D, Bacci S, Lopalco PL. The current state of introduction of HPV vaccination into national immunisation schedules in Europe: results of the VENICE 2008 survey. *Eur J Cancer* 2009;45:2709-13.
29. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: End of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015;136:189–19.
30. Benevolo M, Terrenato I, Mottolese M, Marandino F, Muti P, Carosi M, et al. Comparative evaluation of nm23 and p16 expression as biomarkers of high-risk human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia 2(+) lesions of the uterine cervix. *Histopathology* 2010;57:580-6
31. Razmpoosh M, Sansregret A, Oligny LL, Patey N, Dormoy-Raclet V, Ducruet T, et al. Assessment of correlation between p16INK4a staining, specific subtype of human papillomavirus, and progression of LSIL/CIN1 lesions: first comparative study. *Am J Clin Pathol.* 2014;142:104-10.