

DetECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN PACIENTES CON CITOLOGÍA ANORMAL: UN ESTUDIO PRELIMINAR.

Juan Carlos Sepúlveda Arias.

Médico y Cirujano. Doctor en Ciencias Biomédicas. Docente Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

Julieta Henao Bonilla.

Médica y Cirujana. Especialista en Genética Médica. Docente Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

Luz Eliana Mantilla Muriel.

Licenciada en Biología y Química. Joven Investigadora de Colciencias, Universidad de Caldas-Universidad Tecnológica de Pereira.

Gloria Liliana Porras Hurtado.

Médica y Cirujana. Especialista en Biología Molecular. Laboratorio de Genética Médica, Universidad Tecnológica de Pereira.

Leonardo Angarita Beltrán.

Químico Industrial. Laboratorio de Genética Médica, Universidad Tecnológica de Pereira.

Resumen

El cáncer de cuello uterino es una de las formas más comunes de cáncer en mujeres a nivel mundial y su desarrollo es un proceso multifactorial; sin embargo, los virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo se han asociado con su etiología. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de la infección con VPH en pacientes con citología anormal que consultaron para colposcopia en la unidad intermedia de Kennedy de la ciudad de Pereira. Se estudiaron 129 pacientes en el período Mayo-Noviembre de 2005 a las cuales se les tomó citología con citocepillo y se realizó extracción de ADN con el material obtenido. Se obtuvo ADN en las muestras de 123 pacientes, procediéndose entonces a realizar la detección del ADN viral mediante PCR con los primers GP5+/GP6+ y con la PCR anidada que emplea los primers MY09/11 y GP5+/GP6+. Bajo nuestras condiciones experimentales, la PCR anidada detectó un mayor número de infecciones por VPH que la PCR convencional. La prevalencia de la infección según diagnóstico citológico fue de 59.2% para ASCUS, 66.1% para LBG y 87.5% para LAG. La prevalencia global de la infección fue de 63.4%, con predominio significativo en mujeres con edades entre 15 y 34 años ($p < 0.05$). En conclusión, los resultados muestran una prevalencia de infección por VPH similar a la observada en otros países en pacientes con citología anormal. Este es el primer estudio de su tipo realizado en Pereira y el eje cafetero.

Palabras clave: VPH-ADN, PCR, citología cervical anormal, prevalencia.

Abstract

Cervical cancer is one of the most common causes of cancer in women and its development is multifactorial. High risk human papillomaviruses are recognized as the major contributor in the development of cervical cancer. The primary goal of this study was to determine the prevalence of HPV infection in patients with abnormal cytology attending the colposcopy service at Unidad Intermedia de Kennedy in Pereira. 129 patients were studied from the time period May–November 2005. Cytology was obtained from each patient using a cytobrush and the material was used to carry out DNA extraction. DNA was obtained from 123 samples and used to detect viral DNA by both conventional PCR with GP5+/GP6+ primers and nested PCR with MY09/11 and GP5+/GP6+ primers. Under our experimental conditions, nested PCR allowed to detect a higher number of HPV infections compared with the conventional PCR. The prevalence of infection according to cytological diagnosis was 59.2% for ASCUS, 66.1% for LSIL and 87.5% for HSIL. The overall prevalence of infection was 63.4%. Women aged 15–34 had the highest prevalence of HPV infection ($p < 0.05$). In conclusion, the results show a prevalence of HPV infection in patients with abnormal cytology similar to the observed in other countries. This is the first study detecting HPV DNA in Pereira and eje cafetero.

Key words: HPV DNA, PCR, abnormal cervical cytology, prevalence

Recibido para publicación: 23-06-2006

Aceptado para publicación: 12-10-2006

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial, ocupando el segundo lugar en incidencia (52000 casos nuevos por año) después del cáncer de seno (1-4). Más de 200.000 muertes son registradas cada año, predominantemente en naciones en vía de desarrollo y en mujeres de bajos recursos económicos en edades entre 15-64 años; registrando 25.000 muertes anuales en países de Latinoamérica y el Caribe (5, 6). En Colombia, es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en edad reproductiva (4, 7) y la segunda causa de mortalidad global en mujeres con una incidencia de 34.4 por cada 100.000 mujeres (3, 8), correspondiendo a una de las incidencias de CCU más altas en el mundo. Según los registros correspondientes a los años 1989–1993 del Instituto Nacional de Cancerología, alrededor de 81% de los casos de CCU representaron estadios avanzados de cáncer.

En Pereira, la prevalencia de CCU en el año 2001 fue de 3.46%. De 9410 pacientes tamizadas con citología cervical, 323 resultaron anormales y de éstas, el 37.83% se asociaron con cambios citológicos indirectos de la presencia del virus del papiloma humano (VPH) (Secretaría de Salud del Risaralda, Información personal).

Uno de los principales descubrimientos en la etiología del cáncer a nivel mundial ha sido el reconocimiento del papel del VPH en el desarrollo del CCU. Existe entonces una relación causal entre infecciones persistentes con el VPH de alto riesgo (*tipos 16,18, 31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66*) y el desarrollo de CCU (9-11). Sin embargo, los mecanismos precisos para la iniciación del CCU no son claros. Adicionalmente, existen VPH de bajo riesgo (*tipos 6,11,40,42,43,44,54,61,72,81*), débilmente asociados con CCU (10).

Se ha propuesto entonces al VPH como la primera causa necesaria para el desarrollo de CCU (12); sin embargo, no todas las mujeres infectadas con VPH desarrollan CCU y se han reportado casos de CCU en mujeres sanas (13). Lo anterior indica que hay otros co-factores necesarios para el desarrollo del CCU. Entre éstos cofactores caben mencionar aquellos relacionados con la actividad sexual, factores hormonales (uso de anticonceptivos orales y multiparidad), enfermedades de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis*), consumo de cigarrillo, factores dietéticos e incluso exposición al humo de leña (14-16).

La citología vaginal ha tenido un gran impacto sobre la incidencia y el índice de mortalidad del CCU; sin embargo, plantea problemas como la presencia de falsos negativos y la variabilidad en la terminología empleada para la clasificación de Papanicolau. Por este motivo, se ha incrementado la búsqueda de nuevas metodologías para detectar precursores de CCU clínicamente significantes, con adecuada sensibilidad y especificidad. Existen diferentes métodos para la detección del VPH, entre los que cabe mencionar métodos de sonda directa como la hibridización en Southern e *In Situ*, métodos de amplificación de señal como la captura híbrida II (hc II) y los métodos de amplificación de blancos virales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los métodos de PCR más ampliamente usados para la detección del ácido desoxiribonucleico (ADN) del VPH involucran los sistemas de primers GP5+/GP6+ y MY09/11 (17-21). Estos primers tienen como blanco la región conservada L1 del genoma viral, permitiendo la detección de un amplio rango de tipos virales. Este método permite además determinar el tipo de VPH mediante secuenciación del producto de PCR (22-23).

En este estudio, implementamos la detección del ADN viral mediante PCR empleando los primers GP5+/GP6+ y MY09/11, en una muestra de 129 mujeres que consultaron para colposcopia debido a la presencia de citología anormal, en la Unidad intermedia de Kennedy de la ciudad de Pereira. El presente trabajo se constituye en el primero en su género realizado en la ciudad de Pereira.

Material y métodos

Población de estudio: Se seleccionaron 129 pacientes entre los 17 y 64 años con citología anormal que consultaron para realización de colposcopia en la unidad Intermedia de Kennedy de la ciudad de Pereira durante el período Mayo-Noviembre de 2005. En la consulta con el colposcopista, se invitó a las pacientes para participar en el estudio, se indicaron los beneficios y riesgos del procedimiento y se firmó el consentimiento informado.

Toma de la muestra y extracción de DNA: Bajo colposcopia y empleando un citocépilo, se tomó una muestra de endo y exocervix antes de la realización de cualquier otro procedimiento como toma de biopsia o topicación. No se tomaron muestras de pacientes con

patología infecciosa de vagina y cervix o en aquellas donde se detectó sangrado durante el procedimiento, dado que la sangre es un inhibidor de la PCR. Se lavó el citocépilo con 1mL de Buffer fosfato salino (PBS) y se centrifugó el material obtenido a 2000g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 500µL de PBS y se empleó la suspensión celular para la extracción de ADN empleando el Kit de Extracción GFX (Amersham Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección de ADN viral mediante PCR: Para estimar la integridad del ADN en las muestras, se amplificó un fragmento génico de 110pb de la β-globina empleado los primers PCO3/PCO4 (24). La mezcla de reacción (25µL) consistió en 20mM tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 76µM de cada uno de los dNTPs, 1.5pmol de cada uno de los primers, 0.5U de Taq polimerasa y 10µL de ADN. Luego de la desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, se realizaron 35 ciclos de amplificación (30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 45 s a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 4 min. Como control positivo se empleó ADN obtenido de sangre de personas normales y como control negativo se empleó agua destilada en lugar de ADN en la mezcla de reacción. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 3%.

Las muestras donde se amplificó ADN se sometieron a detección del ADN viral mediante PCR, empleando inicialmente los primers GP5+/GP6+, que amplifican un fragmento de 150pb en la región conservada del gen L1 del VPH (19). La mezcla de reacción (25µL) consistió en buffer 10x (Invitrogen), 25mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 50pmol de cada uno de los primers Gp5+/GP6+ y 0.63U de Taq polimerasa. Luego de una desnaturalización inicial de 5min a 94°C, se realizaron 35 ciclos de amplificación (1 min a 95°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 5 minutos (25). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 3%.

Las muestras negativas en ésta PCR, se sometieron a una PCR anidada con los primers MY11/MY09 (PCR primaria), los cuales amplifican un fragmento de 450pb en la región conservada del gen L1 del VPH (17) y los primers GP5+/GP6+ (PCR secundaria), los cuáles amplifican un fragmento de 150pb en la región conservada del gen L1 de VPH (19). La reacción se llevó a cabo según condiciones descritas (25). En la primera reacción, 10µL de ADN se amplificaron con

los primers MY11/MY09, en una mezcla de reacción (25µL) similar a la empleada para la amplificación de β-globina, pero con 2U de Taq polimerasa, 6mM de MgCl₂ y 200µM de cada uno de los dNTPs. Luego de una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, se realizaron 40 ciclos de amplificación (1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 10 min a 72°C) y una extensión final a 72°C durante 10 min. En la segunda reacción, 5µL del ADN amplificado en la primera reacción se amplificó con los primers GP5⁺/GP6⁺, en una mezcla de reacción similar a la empleada en la primera reacción, excepto que la concentración de MgCl₂ fue 3.5mM. Luego

de la desnaturalización inicial por 2 min a 94°C, se realizaron 40 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 4 s a 48°C, 30 s a 38°C, 5 s a 42°C, 1.5 min a 71°C) y una extensión final a 72°C de 10 min. Como control positivo se empleó ADN de una muestra positiva para VPH, confirmada por secuenciación y como control negativo se empleó agua destilada en lugar de ADN en la mezcla de reacción. El producto de amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 3%. En la tabla 1 se presentan las secuencias de los primers empleados en las reacciones de PCR.

Tabla 1. Secuencias de los primers empleados en las reacciones de PCR.

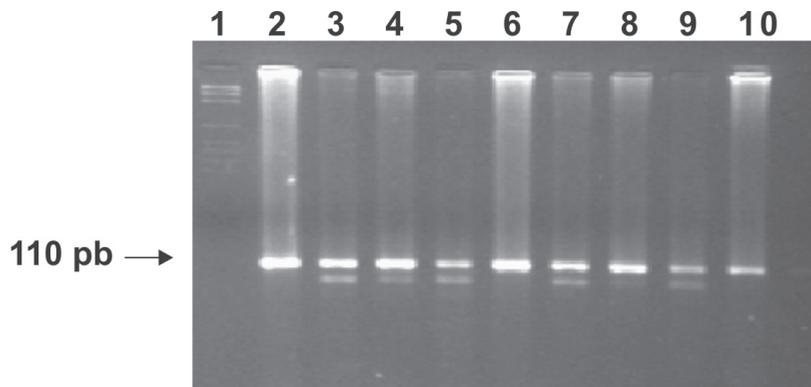
Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del Producto
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	110 pb
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	
GP5 ⁺	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	150 pb
GP6 ⁺	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	
MY09	CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC	450 pb
MY11	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG	

Resultados

La edad de las pacientes fluctuó entre 17 y 64 años. La mayoría de las mujeres se ubican en el rango de edad de 25-34 años. Los diagnósticos citológicos incluyeron 54 pacientes con atipias de células escamosas de naturaleza indeterminada (ASCUS), 59 pacientes

con lesiones de bajo grado (LBG), 8 pacientes con lesiones de alto grado (LAG) y 2 pacientes con atipias de células glandulares de naturaleza indeterminada (AGUS), como se indica en la tabla 2. Las muestras de 123 pacientes fueron positivas para β-globina con 35 ciclos de amplificación, mostrando una banda de amplificación de 110pb (figura 1).

Figura 1. Amplificación de un fragmento de 110 pb de la β-globina



1. Marcador de peso molecular. 2. Control positivo. 3-10. Muestras de pacientes

El ADN viral fue amplificado en las muestras empleando una reacción de PCR con los primers GP5⁺/GP6⁺ (tabla 2). El 27.8% de las muestras con ASCUS, 28.8% de las muestras con LBG y el 37.5% de las muestras con LAG fueron positivas para VPH. No se detectó ADN viral en las muestras con diagnóstico citológico de AGUS.

Con el fin de incrementar la detección del ADN viral, las muestras negativas en la PCR anterior se sometieron a una nueva ronda de amplificación mediante una PCR anidada con los pares de primers

MY11/MY09 y GP5⁺/GP6⁺. De ésta manera, se logró detectar ADN viral en el 43.6%, 52.4% y 80% de las muestras con diagnóstico citológico de ASCUS, LBG y LAG, respectivamente (tabla 3). Nuevamente, la detección de ADN viral fue mayor en pacientes con LAG. La figura 3 muestra el producto de amplificación obtenido con la PCR anidada. Si tenemos en cuenta el total de las muestras positivas para VPH, la prevalencia de la infección en pacientes con diagnóstico citológico anormal fue de 59.2% para ASCUS, 66.1% para LBG, 87.5% para LAG y 0% para AGUS.

Tabla 2. Detección de ADN viral empleando primers GP5⁺/GP6⁺

Hallazgo Citológico	Número (%) positivos primers GP5 ⁺ /GP6 ⁺
ASCUS	15/54 (27.8%)
LBG	17/59 (28.8%)
LAG	3/8 (37.5%)
AGUS	0/2 (0%)

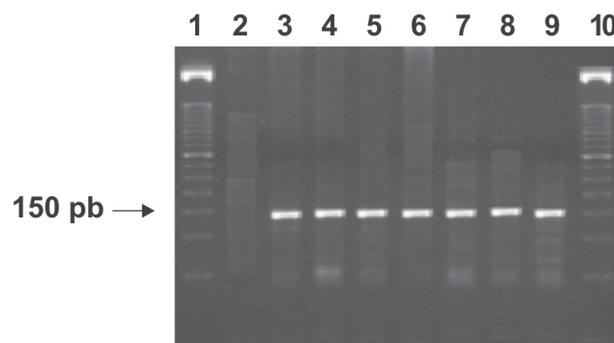
ASCUS: Atipias de células escamosas de naturaleza indeterminada; LBG: Lesión de bajo grado; LAG: Lesión de alto grado; AGUS: Atipias de células glandulares de naturaleza indeterminada.

Tabla 3. Detección de ADN viral empleando PCR anidada

Hallazgo Citológico	Número (%) positivos primers MY/GP
ASCUS	17/39 (43.6%)
LBG	22/42 (52.4%)
LAG	4/5 (80.0%)
AGUS	0/2 (0%)

Ver abreviaturas de la tabla 2.

Figura 2. PCR anidada con los primers MY/GP



1,10. Marcador de peso molecular. 2. Control negativo. 3. Control positivo. 4 – 9. Muestras de pacientes.

La prevalencia de la infección por VPH por grupos de edad se muestra en la tabla 4. La mayor prevalencia de la infección se encuentra en los grupos de edad comprendidos entre los 15-24 y 25-34 años (78.1% y 80%, respectivamente), declinando sustancialmente a medida que se incrementa la edad. De las 121

pacientes evaluadas, 78 fueron positivas para VPH, indicando una prevalencia total de infección por VPH del 63.4% en pacientes con citología anormal. Es interesante indicar que 39 pacientes con citología anormal presentaron una colposcopia normal y en éstas, 14 (35.9%) fueron positivas para VPH.

Tabla 4. Prevalencia de la infección con VPH por grupos de edad

EDAD	ASCUS	LBG	LAG	AGUS	TOTAL	PORCENTAJE
15-24	11/15	12/14	2/3	0	25/32	78.1%
25-34	13/14	11/17	4/4	0	28/35	80%
35-44	3/11	9/17	0	0/1	12/29	41.4%
45-54	4/11	7/11	0	0/1	11/23	47.8%
55-64	1/3	0	1/1	0	2/4	50%

Ver abreviaturas de la tabla 2.

Discusión

Es clara la asociación etiológica entre VPH y el desarrollo de cáncer cervical, lo cuál ha motivado la realización de un sinnúmero de estudios con relación a prevalencia de la infección en mujeres con citologías normal, anormal o en pacientes con CCU. El propósito de nuestro estudio fue establecer la metodología para realizar la detección de DNA viral y determinar así la prevalencia de la infección en mujeres con citología anormal. Este es el primer estudio de prevalencia de la infección por VPH realizado en el Departamento del Risaralda.

La integridad del DNA en las muestras fue adecuada dado que la mayoría de las muestras fueron positivas al realizar la PCR para β -globina, indicando que el citocepillo posee cantidad adecuada de células para la extracción de ADN.

Los resultados indican que la PCR anidada con los primers MY11/MY09 y GP5⁺/GP6⁺ es mas sensible para la detección de ADN viral, comparada con la PCR convencional con los primers GP5⁺/GP6⁺, como ha sido reportado previamente (25).

La prevalencia global de la infección por VPH en pacientes con citología anormal fue de 63.4%. Esta cifra es alta si tenemos en cuenta otros estudios en

Colombia y Chile, donde la prevalencia de la infección en el mismo grupo de pacientes fue de 39.1% y 55.9% respectivamente (26, 27), pero es similar a la reportada en dos estudios realizados en Bélgica y Estados Unidos en pacientes con anormalidades citológicas, donde la prevalencia global de la infección fue de 65.8% y 66.6% respectivamente (28, 29). Es importante tener en cuenta que la comparación entre estudios es difícil dado que no se empleó la misma metodología para la detección del ADN viral.

Si tenemos en cuenta el diagnóstico citológico, la prevalencia de la infección fue de 59.2% para ASCUS, 66.1% para LBG, 87.5% para LAG y 0% para AGUS. Ninguno de los estudios realizados en Latinoamérica en pacientes con citología anormal reporta el diagnóstico citológico. Beerens et al (28), reportan prevalencias de infección de 42.6% en ASCUS, 79.3% en LBG, 88.6% en LAG y 50% en AGUS; mientras que Pirog et al (29) encontraron prevalencias de 49.4% en ASCUS, 95.8% en LBG y 90% en LAG. Aunque nuestro estudio no es similar en tamaño de muestra y metodología para la detección viral a los trabajos mencionados anteriormente, los resultados son similares. La discrepancia en las pacientes con diagnóstico de AGUS puede ser el reflejo del mayor número de casos en ésta categoría analizado en los estudios mencionados.

Con relación a la prevalencia de la infección por grupos de edad, independiente del diagnóstico citológico, las mujeres con edades entre 15-34 años tuvieron la mayor prevalencia de VPH (79.1%), comparada con (46.3%) en los otros grupos de edad, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), lo cual concuerda con lo reportado en otro estudio donde la prevalencia entre los 15 y 34 años fue de 76.6% (28).

En conclusión, nuestros resultados muestran una prevalencia de infección por VPH similar a la observada en otros países en pacientes con citología anormal y se constituye en el primer estudio de su tipo en Pereira y el eje cafetero. Dada la importancia de la detección y la tipificación viral como estrategia de tamizaje costo-efectiva para la reducción del riesgo de CCU (2) y como prerrequisito para la implementación

futura de estrategias de vacunación, nuestro estudio servirá de punto de partida para iniciar trabajos tendientes a determinar los tipos virales circulantes en nuestra eco-región cafetera, tanto en pacientes con citología normal como anormal. Pretendemos de esta manera obtener información útil para los programas de prevención de CCU, creando así conciencia sobre la utilidad de la detección y tipificación viral como una nueva estrategia de prevención de la enfermedad.

Agradecimientos

Este proyecto contó con la financiación por parte de COLCIENCIAS y la Universidad de Caldas de un Jóven Investigador: Luz Eliana Mantilla Muriel.

Referencias bibliográficas.

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J. Cancer.* 1999; 80:827-841.
2. Goldie SJ., Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, et al. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353:2158-68.
3. Parkin DM, Pisani P, Ferlay, J. Global cancer statistics. *Cancer Clin. J.* 1999; 49:33-64.
4. Parkin DM, Bray, F Ferlay, J. et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer.* 2001; 94:153-156.
5. National Institute of Health. Cervical Cancer. *NIH consensus statement.* 1996; 14:1-38.
6. Bishop A, Sherris J, Tsu VD et al. Cervical dysplasia treatment: key issues for developing countries. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 1996; 30:378-386
7. Medina, M. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia 1990. Instituto Nacional de Cancerología; Nuevas ediciones, Santafé de Bogotá. 1994:76-77.
8. Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer.* 1999; 83:18-29.
9. Schiffmann MH. New epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87:1345-1347.
10. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 518-527.
11. WHO report 2005. Report of the consultation on human papillomavirus vaccines. pg 2-13.
12. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz, N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002; 55:244-265.
13. Wheeler CM, Parmenter, CA, Hunt WC, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico Student Center. *Sex. Transm. Dis.* 1993; 20:286-289.
14. Au WW, Sierra-Torres, CH, Tying SK. Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer. *Mutat. Res.* 2003; 544:361-364.
15. Muñoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* 2000; 191-5.
16. Ferrera A, Velema JP, Figueroa M, et al. Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *Int. J. Epidemiol.* 2000; 29:817-825.
17. Manos MM, Ting Y, Wright DK, et al. Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomavirus. *Cancer cells.* 1989;7:209-214.
18. Evander M, Edlund K, Boden E, et al. Comparison of one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:987-992.

19. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, van der Brule AJ, et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 1995;76:1057-1062.
20. Jacobs MV, Snijders PJ, van der Brule AJ, et al. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:791-795.
21. Strauss S, Desselberger U, Gray JJ. Detection of genital and cutaneous human papillomavirus types: differences in the sensitivity of generic PCRs, and consequences for clinical virological diagnosis. *Br.J.Biomed.Sci.* 2000; 57:221-225.
22. Rady PL, Chin R, Arany I, et al. Direct sequencing of consensus primer generated PCR fragments of human papillomaviruses. *J. Virol. Methods.* 1993; 43:335-350.
23. Rady PL, Arany I, Hughes TK, et al. Type-specific primer-mediated direct sequencing of consensus primer-generated PCR amplicons of human papilloma viruses: a new approach for the simultaneous detection of multiple viral type infections. *J. Virol. Methods.* 1995; 53:245-254.
24. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230:1350-1354.
25. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, et al. Nested PCR with the PGMY09/011 and GP5*/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J. Virol. Methods.* 2004; 122:87-93.
26. Molano M, Weiderpass E, Posso H, et al. Prevalence and determinants of Chlamydia trachomatis infections in women from Bogotá, Colombia. *Sex. Transm. Inf.* 2003; 79: 474-478.
27. Ferreccio C, Prado R, Luzoro A, et al. Prevalencia poblacional y distribución por edad del Virus Papiloma Humano entre mujeres en Santiago, Chile. *Bol. Escuela de Medicina.* 2005; 30:34-39.
28. Beerens E, Van Renterghem L, Praet M, et al. Human papillomavirus DNA detection in women with primary abnormal cytology of the cervix: prevalence and distribution of HPV genotypes. *Cytopathology.* 2005; 16:199-205.
29. Pirog EC, Erroll M, Harigopal M, et al. Comparison of human papillomavirus DNA prevalence in atypical squamous cells of undetermined significance subcategories as defined by the original Bethesda 1991 and the new Bethesda 2001 systems. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004; 128:527-532.



Niño - Carmen Luisa Betancourt

3^{er}. Puesto - Primer Concurso de Fotografía, Facultad de Ciencias de la Salud-2006