

Infecções causadas por Papilomavírus e desenvolvimento de câncer: aspectos virológicos e epidemiológicos*

Human Papillomavirus infection and cancer development: virological and epidemiological aspects

SÍLVIA MB CAVALCANTI^{1*}, LUCÍLIA G ZARDO², MAURO RL PASSOS^{3**}, LEDY HS OLIVEIRA^{4**}

RESUMO

Nosso estudo foi desenvolvido a fim de determinar a prevalência da infecção por HPV em lesões cervicais e pesquisar a ocorrência de outras DST possivelmente associadas à infecção por estes vírus e à progressão ao câncer. Quinhentas e catorze biópsias foram obtidas de pacientes atendidas no Setor de DST (UFF) e no Hospital Luíza Gomes de Lemos (INCa). Tais biópsias foram classificadas de acordo com o Sistema de Bethesda em: lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), de alto grau (HSIL) e carcinoma das células escamosas (SCC). A detecção de HPVs dos tipos 6/11, 16/18 e 31/33/35 DNA foi feita pela hibridização *in situ*. A prevalência dos HPV oscilou entre 85.6% nas LSIL e 55.2% nas SCC. Os pacientes foram acompanhados pelo período de oito anos: 27.1% das lesões regrediu espontaneamente enquanto 29.3% progrediu ao carcinoma. HPVs de alto risco foram detectados em 80.5% (OR 13.2, P=0.0003) das lesões progressivas. A pesquisa de outras DST revelou que a ocorrência de sífilis, pre-

dominantemente, e também as infecções por HIV e Herpes, estiveram associadas à progressão ao câncer (OR 13.0, P=0.0003). Nosso estudo revelou que HPV e outras DST podem agir de forma cooperativa aumentando o risco de câncer, corroborando a observação de que as pacientes brasileiras que apresentam SILs tem um prognóstico pior do pacientes de outras regiões do mundo.

Palavras-chave: Prevalência de Papilomavírus humano Doenças Sexualmente Transmissíveis, virologia

ABSTRACT

A study was conducted to determine the prevalence of HPV infection in cervical lesions of Brazilian women and to search for other Sexually Transmitted Diseases (STDs) associated with progression to malignancy. Five hundred and fourteen paraffin-embedded biopsies obtained from female cervical lesions were classified according to the Bethesda System in low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high grade SIL (HSIL) and squamous cell carcinoma (SCC). Specimens were tested for the presence of human papillomavirus (HPV) types 6/11, 16/18 and 31/33/35 DNA using non-isotopic *in situ* hybridization. HPV prevalence ranged from 85.6%

^{1,2,3,4} Professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, Setor de Anatomia Patológica e Citopatologia/ **Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis

*Financiado pelo CNPq

Os Papilomavírus Humanos (HPVs) constituem um grupo heterogêneo de vírus de DNA, sendo composto por cerca de 80 genótipos virais distintos

in LSIL to 55.2% in SCC. Patients were analysed through an eight-year period: 27.1% of the lesions spontaneously regressed while 29.3% progressed to carcinoma. High risk types were present in 80.5% (OR 13.2, P=0.0003) of the progressive lesions. History of other sexually transmitted diseases, mainly syphilis, showed to be positively related to progression (OR 13.0, P = 0.0003). Oncogenic HPV types 16 and 18 and history of other Sexually Transmitted Diseases showed to be significantly associated to progression to cancer. Our study indicated that HPV and other STDs can act together, corroborating the observation of a poor prognosis for Brazilian women presenting SILs.

Keywords: Prevalence of HPV infection, Sexually Transmitted Diseases, virology

1. INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus Humanos (HPVs) constituem um grupo heterogêneo de vírus de DNA, sendo composto por cerca de 80 genótipos virais distintos. Dentre eles, quase 30 tipos são capazes de infectar o epitélio do trato genital¹. Achados epidemiológicos e experimentais indicam que os HPVs são os agentes etiológicos do câncer cervical². Assim, estes vírus tem sido classificados, também, de acordo com seu potencial maligno: tipos de alto risco (HPV16,18 e, em menor grau 31,33 e 35) tem sido detectados em lesões intraepiteliais de alto grau (HSILs) e no carcinoma invasivo, enquanto os tipos ditos de baixo risco (HPV6 e 11) tem sido associados a lesões benignas ou SILs de baixo grau (LSILs). Diferenças no potencial oncogênico destes vírus de alto e baixo grau também já foram demonstradas por experimentos de transformação *in vitro*³.

As epidemias de HPV tem sido progressivamente mais frequentes em todo o mundo, principalmente nas 2 últimas décadas e a prevalência destas infecções tem sido estimada como a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis⁴. Além disso, estudos recentes têm documentado a prevalência crescente do câncer genital em países subdesenvolvidos⁵. No Brasil, a incidência anual de câncer genital vem aumentando e o câncer cervical permanece como a primeira causa de morte por câncer em nossas mulheres⁶. Contudo, ainda são poucos os estudos epidemiológicos e virológicos desenvolvidos em nosso país a fim de elucidar a história natural dos HPVs^{7,8}.

O objetivo do nosso estudo foi determinar a prevalência de diferentes tipos de HPVs (de alto e baixo risco) em lesões intraepiteliais cervicais de pacien-

tes atendidas no Setor de DST da UFF e no Hospital Luíza Gomes de Lemos do INCa. Buscamos também relacionar a ocorrência simultânea de outras DST com o desenvolvimento de lesões malignas nestas

pacientes, num período de acompanhamento de oito anos. Nosso trabalho tem como objetivo último conhecer aspectos da patogenia dos HPVs em nosso Estado, e assim contribuir com o processo de prevenção do câncer cervical.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes - o material do presente estudo consistiu de 514 biópsias de lesões de pacientes do sexo feminino atendidas no Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis (SDST) da Universidade Federal Fluminense (UFF) e no Hospital Luíza Gomes de Lemos (INCa), no período de 1990 a 1997. De cada paciente foram retiradas de uma a quatro biópsias. Cada biópsia foi fixada em 10% de formalina tamponada, emblocada em parafina e processada para o diagnóstico histológico e a hibridização *in situ*. As pacientes foram acompanhadas pelo período de 8 anos, com intervalos de 6 meses em média. Os prontuários foram revisados a fim de elucidar a ocorrência de outras DST como infecção por HIV, herpes genital, gonorréia, infecção por Clamídia, doença inflamatória pélvica, tricomoníase and sífilis. Cerca de 38% das pacientes foram tratadas: ablação parcial com alça diatérmica e eletrocauterização foram as técnicas usadas para as LSILs e a conização para as HSILs. As pacientes que não receberam tratamento foram aquelas que não retornaram ao serviço, tendo intervalos de acompanhamento superiores a 6 meses.

Exame Histológico - Cortes de 5mm foram obtidos das biópsias parafinadas, processados para coloração em lâmina com hematoxilina-eosina e avaliados por microscopia ótica. Os achados histológicos foram classificados de acordo com o Sistema de Bethesda⁹ e definidos nas seguintes categorias:

Condiloma e neoplasia intraepitelial de grau I em LSIL; em HSIL, as neoplasias de grau II e III/carcinoma *in situ*, e em carcinoma das células escamosas (SCC). Tecidos histologicamente normais apresentando alterações reativas/reparativas (AR) foram incluídas como tecidos controles.

Detecção do ADN viral:

Sondas - as sondas genéticas de HPV 6,11,16,18, 31, 33, 35 foram gentilmente cedidas pela D^{ra} de Villiers (Papillomavirus International Reference Laboratory, Heidelberg). O material foi amplificado e

*Estudos em países
não industrializados
apresentaram prevalências
de sífilis em gestantes
variando de 3 a 19%*

purificado em gradiente de cloreto de céso. Os plasmídeos foram marcados com Biotina 11-dUTP (Sigma) usando-se um Kit de "Nick Translation" (BRL)

Hibridização *in situ* - Este protocolo já foi descrito anteriormente¹⁰. Cortes de 5mm foram obtidos das biópsias parafinadas e montados em lâminas pré-tratadas com trietoxysilane (Sigma). As lâminas foram desparafinizadas em xilol (2x,10 min) e 100% de etanol (2x,10 min) e lavadas em água corrente (1x, 5 min).

Os ácidos nucléicos foram expostos pela digestão dos cortes com 0,5mg/mL de proteinase K (Sigma) a 37°C por 15 min. A mistura de hibridização continha 5xSSC, 5% de polietilenoglicol, 0,1mg/mL de ADN de esperma de salmão, sondas marcadas com biotina (10mg/mL) e 50% de formamida deionizada. Cada corte recebeu 20mL de mistura de hibridização, foi desnaturado a 92°C por 10 min e hibridizado a 37°C por 2hr. A seguir as lâminas foram lavadas respectivamente em 4xSSC, 0,1xSSC + 50% formamida, 4xSSC e tampão fosfato salina pH7,2 (PBS) por 10 min a temperatura ambiente.

Os híbridos foram detectados com o emprego do complexo conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina a temperatura ambiente por 30 min. O conjugado não associado aos híbridos foi removido por lavagem em Tampão 1 (0,1M Tris-HCl, 0,15M NaCl pH7,5) (2x,10 min) e em Tampão 3 (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂ pH9,5) (1x, 5 min). As lâminas foram então incubadas com o substrato NBT-BCIP (nitrobluetetrazolium-bromochloroindolylphosphate) em diluição de 1/200 em Tampão 3, por 30 min em câmara escura. As lâminas foram rinsadas em água destilada para parar a reação, secas e montadas em glicerina sem coloração de fundo. Esse método é capaz de detectar 50 a 100 cópias de ADN viral por célula¹¹. As células positivas foram detectadas nas camadas superficial e intermediária do epitélio genital e apresentavam precipitado púrpura no núcleo. Biópsias de tecidos infectados e não infectados por HPV foram usados como controles em cada reação.

Análise estatística - a significância estatística dos nossos resultados foi analisada usando o teste de Qui-Quadrado (χ^2) gística multivariada foi utilizada para examinar associação entre fatores e progressão/regressão das lesões, usando-se o programa de computador Epi-Info versão 6.0 (Stone Mountain, GA).

3. RESULTADOS

Foram estudadas quinhentas e catorze biópsias de lesões cervicais a fim de avaliar a prevalência da infecção por HPV. A média de idade dos participantes

foi de 36.7 anos, variando de 15 a 78 anos. A análise demonstrou a ocorrência de diferentes padrões de distribuição de idades, de acordo com o grau histológico da lesão: o grupo LSIL ($X_{idade} = 29.8$) apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo com SCC ($X_{idade} = 47.3$, $P < 0.001$) (tabela 1).

Tabela 1 - Média de idade das pacientes apresentando lesões compatíveis com infecção por HPV

Diagnóstico histológico das pacientes				
Alterações Reativas (n=48)	LSIL (n=160)	HSIL (n=163)	SCC (n=143)	
X idade	30.1	29.8	36.7	47.3

Fonte: Setor DST-UFF/Hospital Luiza Gomes de Lemos, INCa-RJ, 1999

A tabela 2 apresenta os dados de prevalência da infecção pelos HPVs que foi de 66.7% (343/514), variando de 85.6% (137/160) nas LSIL até 55.2% (79/143) nos SCC. O grupo controle (AR) apresentou 14.6% (7/48) de positividade para o DNA do HPV. Diferenças estatísticas significativas foram detectadas entre os tecidos com lesão e os controles (AR) ($P < 0.0001$) quando foi analisada a infecção cervical pelos HPVs.

A prevalência dos diferentes tipos de HPVs é apresentada na tabela 2. Nas LSILs, os HPV 6/11 foram os tipos mais prevalentes (52.6%). Nas HSILs, os HPV 16/18 prevaleceram sobre os demais (47.5%) assim como nas lesões malignas (SCC), nas quais a prevalência dos tipos HPV 16/18 foi alta (60.8%). Os HPVs tipos 31/33/35 foram achados com frequência tanto em lesões HSILs (15%) como em SCC (16.5%). Oitenta e quatro dentre as 343 (24.5%) lesões positivas para HPV apresentaram infecções mistas.

A análise retrospectiva mostrou que de 1990 a

Tabela 2 - Prevalência de tipos de HPV de acordo com o diagnóstico histológico das lesões.

Diagnóstico	Número de pacientes	Tipos de HPV					Prevalência de HPV (%)
		6/11	16/18	31/33/35	mistas		
Alt. Reativas	48	4	2	1	-	7	(14.6%)
LSIL	160	72	24	3	38 ^a	137	(85.6%)
HSIL	163	15	57	18	30 ^b	120	(73.6%)
SCC	143	2	48	13	16 ^c	79	(55.2%)
Total	514	93	131	35	84	343	(66.7%)

Fonte: Setor DST-UFF/Hospital Luiza Gomes de Lemos, INCa-RJ, 1999

a: 26 HPV 6/11, 16/18; 7 HPV 6/11, 31/33/35; 5 HPV 16/18, 31/33/35.

b: 18 HPV 6/11, 16/18; 1 HPV 6/11, 31/33/35; 11 HPV 16/18, 31/33/35.

c: 11 HPV 6/11, 16/18; 3 HPV 16/18, 31/33/35; 2 HPV 6/11, 16/18, 31/33/35.

Nosso estudo descreve a frequente presença de lesões cervicais causadas por múltiplos tipos de HPV, constituindo um percentual de 24.5% de todas as infecções

4. DISCUSSÃO

1997, foram tratadas 192 das 514 pacientes acompanhadas. Ablação parcial com alça diatérmica e electrocauterização foram os tratamentos de escolha para as LSILs, para as HSILs foi mais comumente aplicada a conização. Ainda assim, cerca de 280 pacientes não receberam tratamento, ou porque apresentaram cura espontânea ou porque não retornaram aos centros de atendimento conforme recomendado. Nossos dados revelaram que 27.1% (76/280) das pacientes que não foram tratadas, as lesões por HPV regrediram espontaneamente, mas em 29.3% (82/280) as lesões apresentaram progressão ao carcinoma *in situ* ou ao câncer invasivo. Na tabela 3, podemos observar que 64.4% (49/76) dos casos que regrediram espontaneamente, apresentavam tipos de baixo risco 6/11 ($X^2 = 19.7$, $P=0.00001$). Inversamente, 80.5% (66/82) dos casos que evoluíram, apresentavam tipos de alto risco. Assim, os tipos oncogênicos 16/18 foram estreitamente associados à progressão maligna (OR 13.2, $P=0.0003$), enquanto os HPVs tipos 31/33/35 não apresentaram correlação significativa (OR 1.2, $P=0.7$).

A ocorrência simultânea de outras DST é um importante cofator usualmente associado à progressão maligna. De fato, em nosso estudo, das pacientes com lesões progressivas, 75.6% tinham outra DST (62/82). Das pacientes com quadro de regressão espontânea, somente 23.7% (18/76) tinham outras DST. Após ajuste de variáveis para análise estatística, a presença de outras DST simultâneas pôde ser significativamente associada à progressão maligna (OR 13.0, $P=0.0003$). Os dados estão descritos na tabela 3.

A tabela 3 mostra as diferentes DST associadas à progressão das lesões causadas pelos HPVs ao câncer. Valores com significância estatística foram encontrados para as infecções por Herpes e HIV ($P<0.005$) mas os dados mais interessantes foram aqueles encontrados para Sífilis ($P<0,0001$).

Em nosso estudo, 343 das 514 (73.9%) biópsias cervicais estavam infectadas pelos HPVs. Prevalências similares já haviam sido descritas, usando-se sistemas de detecção similares ao nosso^{12,13,14}: noventa e três biópsias (27.1%) continham HPV6/11, 131 (38.2%) continham HPV16/18 e 35 (10.6%), HPV31/33/35. Os HPVs 16 and 18, oncogênicos, foram os tipos genômicos mais comuns em lesões malignas, apresentando um padrão crescente com alta significância estatística das LSIL para o carcinoma (SCC) (tabela 2, $P<0.0002$). Os tipos HPV 6 and 11 não parecem representar papel importante no evento de carcinogênese, uma vez que a prevalência destes vírus apresenta uma curva decrescente significativa das LSIL para o SCC ($P<0.00001$). Pudemos também observar que tanto o HPV 6 como o 11 raramente foram encontrados em lesões pré-malignas e malignas (0.6%). Nossos resultados corroboram a importância dos HPVs 16 e 18 na patogênese do câncer cervical e ainda, apontam os tipos 31,33 e 35 como vírus associados à malignidade em proporções relevantes (16.5%).

Nosso estudo descreve a freqüente presença de lesões cervicais causadas por múltiplos tipos de HPV, constituindo um percentual de 24.5% de todas as infecções. Segundo Reid e cols¹³, altas taxas destas infecções mistas são detectadas em todos os continentes e devem ser atribuídas ao comportamento sexual promíscuo. Entretanto, a ocorrência destas infecções ainda não está claramente relacionada à progressão das lesões ao câncer. Em nosso trabalho, não pudemos relacioná-las ao desenvolvimento de lesões malignas, uma vez que percentual semelhante foi encontrado para lesões que sofreram regressão espontânea (19.7%) e para as lesões que progrediram ao câncer (25.6%) ($\chi^2=0.9$, $P>0.1$).

A avaliação da história natural da infecção pelo HPV indicou um alto risco de progressão (29.3%). Lesões com regressão espontânea foram detectadas em apenas 27.1% dos casos. Kataja e cols¹⁵, durante *follow-up* de 8 anos, observaram que quase 65% das infecções por HPV regrediu enquanto somente 14% dos pacientes progrediu ao câncer. Tais discrepâncias de resultados podem ser atribuídas a diferente distribuição de tipos de HPV, na Europa e no Brasil. Em nosso país o HPV 18 é comumente detectado em lesões de alto grau⁹. Este fato poderia explicar o prognóstico ruim, e mesmo pior, das nossas pacientes, uma vez que este tipo viral tem maior potencial maligno^{16,17,18}. O nosso trabalho revelou também que 80.5% (OR 13.2, $P=0.0003$) das lesões

Tabela 3 - Fatores de risco associados à progressão das lesões cervicais ao câncer

Fatores de risco	Nº de casos regressivos	Nº de casos progressivos	Odds Ratio Ajustada (95%CI)	Valores de P
HPV tipo 6/11				
Negativos	27	80	1.0	0.00001
Positivos	49 ^a	2	0.02(0.0-0.2)	
HPV tipos 16/18				
Negativo	54	16	1.0	0.00003
Positivo	22 ^a	66 ^c	13.2 (1.9-58.6)	
HPV tipos 31/33/35				
Negativo	61	67	1.0	0.7
Positivo	15	15 ^d	1.2(0.2-7.3)	
Outras DST				
Negativo	58	20	1.0	0.0003
Positivo	18	62	13.0(1.9-56.3)	

Fonte: Setor DST-UFF/Hospital Luiza Gomes de Lemos, INCa-RJ, 1999
^{a/b} - 12 e 3 infecções mistas por HPV, respectivamente
^{c/d} - 15 e 6 infecções mistas por HPV, “

progressivas apresentavam os HPVs 16 and 18, contrastando com os casos de regressão onde os tipos benignos foram prevalentes (64%, OR 0.02, P=0.000009).

Como descrito na tabela 3, outras DST de ocorrência simultânea à infecção por HPV mostraram relevância estatística na progressão ao câncer (OR 13.0, P=0.0002). Nós propomos que DST como infecções por Herpes simplex, por HIV e principalmente pelo *Treponema pallidum* podem contribuir para a progressão das lesões por HPV ao câncer. Tais infecções poderiam atuar como co-fatores na ativação de mecanismos de transformação celular bem como na depressão da resposta imune no trato genital. Sabe-se que os mecanismos de defesa celular do hospedeiro têm papel primordial no controle das infecções por HPV¹⁹. Pacientes como imunodeficiências tem infecções por HPV mais prevalentes além de serem mais susceptíveis ao desenvolvimento de HSILs^{20,21}. Em nosso estudo foi bastante clara a importância da sífilis como marcadora da progressão ao câncer (tabela 4), principalmente quando sabemos estar frente ao recrudescimento desta infecção em nosso país.

Tabela 4 - Doenças Sexualmente Transmissíveis associadas à evolução da lesão por HPV ao Câncer

DST	Lesões regressivas	Lesões progressivas
Infecção por Herpes simplex	3	8
Infecção por HIV	-	8
Infecção por Clamídia	1	4
Sífilis	-	18
Tricomoníase	5	8
Gonorréia	1	4
Inflamação bacteriana pélvica	6	9
DST Associadas	2	3
Total	18	62

Fonte: Setor DST-UFF/Hospital Luiza Gomes de Lemos, INCa-RJ, 1999

Neste trabalho, apresentamos os resultados de um estudo de 8 anos. Pudemos, nele observar que os tipos oncogênicos de HPV e a presença de outras DST simultaneamente estão inequivocamente associadas ao câncer, de modo cooperativo. Tais resultados parecem justificar o pior prognóstico das pacientes que apresentam lesões por HPV no Brasil.

Agradecimento

Ao Sr. **Edson Alves de Souza** por sua assistência técnica

Endereço para correspondência:

Silvia MB Cavalcanti

Fax: (21) 620-5266

E-mail: silviabc@ism.com.br

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Villiers EM. Heterogeneity of human papillomavirus group. *J Virol* 63: 4898-4903. 1989.
2. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Cur Microbiol Immunol* . 186: 56-78. 1994
3. Woodworth CD, Doniger J, Di Paolo JA. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs correspond to their association with cervical carcinoma. *J Virol* 63: 159-164. 1989
4. Syrjanen KJ. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their association with genital squamous cell cancer. *APMIS* 97: 957-970. 1989
5. Lowy DR, Kimbaurer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Nat Acad Sci USA*. 91: 24 36-2440. 1994
6. Registro Nacional de Patologias Tumorais. Diagnóstico de Câncer. INCa (Pro-Onco), Ministério da Saúde, Brasil. 1985/1991. 1992
7. Cavalcanti SMB, Deus FCC, Zardo LG, Frugulhetti ICP, Oliveira LHS. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 91: 433-440. 1996
8. Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 71: 321-341. 1997
9. Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *Acta Cytol* 37: 115-124. 1993
10. Cavalcanti SMB, Frugulhetti ICP, Passos MRL, Fonseca MEF, Oliveira LHS. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 575-580. 1994
11. Syrjanen SM. Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in the detection of human papillomavirus (HPV) infections. *APMIS*. 98: 95-110. 1990
12. Kiviat NB, Koutsky LA, Paavonen JA. Prevalence of genital papillomavirus infection among women attending a college student clinic or a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis* 159: 293-302. 1989
13. Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Stanhope R, Hershman VR, Smith JP, Lancaster WD. Sexually transmitted papillomavirus infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156: 212-222. 1987
14. Kristiansen E, Jenkins A, Kristiansen G, Ask E, Kaern J, Abeler J, Lindqvist BH, Tropé C, Kristiansen BE 1994. Human papillomavirus infection in Norwegian women with cervical cancer. *APMIS* 102: 122-128. 1997
15. Kataja V, Syrjanen S, Mantjarvi R. Prognostic factors in cervical human papillomavirus infections. *Sex Transm Dis* 19: 154-160. 1992
16. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Culver HA, Vasilev AS, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl* 88: 1361-1368. 1996
17. Barnes W, Woodworth C, Wagooner S. Rapid dysplastic transformation of human genital cells by human papillomavirus type 18. *Gynecol Oncol* 38: 343-346. 1990
18. Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Berhen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* . 74: 781-785. 1989
19. Ho GYF, Burk RD, Fleming I, Klein RS. Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56: 788-792. 1994
20. Meekin GE, Sparrow MJ, Fernwicke RJ, Tobias M. Prevalence of genital human papillomavirus infection in Wellington women. *Genitorin Med* 68: 228-232. 1992
21. Van Doornum GJJ, Van den Hoek JAR, Van Ameijden EJC, Van Haastrecht HJA, Roos MTL, Henquet CJM, Quint WGV, Coutinho RA. Cervical HPV infection among HIV-infected prostitutes addicted to hard drugs. *J Med Virol* 41: 185-190. 1993