

Trabajos Originales

Genotipificación del virus del papiloma humano en mujeres que asisten a un hospital gineco-obstétrico de tercer nivel de la Ciudad de México

Saúl Flores-Medina, PhD.^{1,2}, Carmen Selene García-Romero, PhD.¹, Diana Mercedes Soriano-Becerril, MSc.¹, Ricardo Figueroa-Damián¹, Gonzalo Márquez-Acosta.³

¹Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología. ²CECyT No. 15 "DAE", Instituto Politécnico Nacional. ³Coordinación de Colposcopia, Instituto Nacional de Perinatología. Ciudad de México, México.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la frecuencia de infección por el virus del papiloma humano en pacientes que acudieron a un hospital de tercer nivel de atención en la Ciudad de México. **Método:** Se realizó un estudio prospectivo, transversal y descriptivo que incluyó 65 mujeres entre 15 a 46 años que asistieron a consulta para atención gineco-obstétrica. A todas las participantes se les tomó una muestra cervical para la detección/genotipificación del papiloma virus mediante la prueba Linear Array HPV Genotyping Test in vitro® (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). **Resultados:** Un total de 36 (55,4%) pacientes resultaron positivas al virus, en las que se identificaron 65 genotipos virales tanto en infección única (38,9%) como en infección por múltiples (61,1%) genotipos. El 29,2% de los genotipos identificados, fueron de alto riesgo. Los genotipos de alto riesgo más frecuentes fueron: VPH52 y 51; mientras que los genotipos de bajo riesgo más comunes fueron: VPH6 y 53. Un tercio de las pacientes con infección mostraron al menos un genotipo de alto riesgo. **Conclusión:** En este estudio, se observó una frecuencia relativamente baja de genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano, sin embargo se identificó un porcentaje importante de co-infección por múltiples genotipos. Por esta razón, se considera necesario dar seguimiento a mediano y largo plazo para monitorear la evolución de la infección.

PALABRAS CLAVE: *Virus del papiloma humano, genotipos de alto riesgo, cáncer cervical, coinfección, prevalencia*

SUMMARY

Objective: To identify which are the most frequent genotypes of human papilloma virus among a group of gynecologic-obstetric patients at tertiary care hospital in Mexico City. **Method:** A prospective and descriptive cross-sectional study was carried out among a group of 65 women, aged 15-46 years, receiving gynecological-obstetric care. Cervical specimens were taken from all participants for direct HPV detection/genotyping by means of a Linear Array HPV Genotyping Test in vitro® (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ). **Results:** Virus detection was achieved in 36 patients (55.4%), with a total of 65 genotypes, either as single (38.9%) or multiple-genotype (61.1%) infections. High risk genotypes accounted for only 29.2% of all genotype. The most frequent high risk genotypes were HPV52 and 51, while HPV6 and 53 were the most frequent low risk ones. At least one high risk genotype was present in one third of infected patients. **Conclusion:** The relative low frequency of oncogenic human papilloma virus genotypes among the women in this study was observed, however a significant percentage of co-infection with multiple genotypes were

identified. Thus, mid- to long-term follow up might be necessary for those patients to monitor the evolution of the infection.

KEY WORDS: *Human papilloma virus, high risk genotypes, cervical cancer, multiple-genotype infection, frequency*

INTRODUCCIÓN

En mujeres el principal factor de riesgo para desarrollar lesiones epiteliales pre-malignas y malignas en cérvix, vagina o vulva, suele ser la infección persistente por ciertos genotipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH) (1,2), sin embargo, no es causa exclusiva y otros factores de riesgo están involucrados, incluyendo: inicio de relaciones sexuales a temprana edad, múltiples parejas sexuales, prácticas sexuales de riesgo, respuesta inmunitaria deficiente del huésped, predisposición genética, tabaquismo, otras infecciones de transmisión sexual y el uso de anticonceptivos orales, entre otros (3-5).

Los genotipos de VPH que afectan el tracto genito-urinario se clasifican en genotipos de alto riesgo relacionados al desarrollo de cáncer y genotipos de bajo riesgo asociados a la aparición de condilomas (4,6). De acuerdo a la variación en su material genético, se han caracterizado 40 genotipos de VPH que infectan la región ano-genital en el humano, de ellos 15 se reconocen como virus oncogénicos que afectan el epitelio escamoso y estratificado (3,6).

Se ha informado que la prevalencia de infección por VPH en mujeres embarazadas es muy variada, con frecuencias que van desde 5% hasta 70%, dependiendo de la persistencia de la infección (7,8).

El objetivo del presente estudio fue identificar los genotipos más frecuentes del VPH en pacientes gineco-obstétricas que asistieron al Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México.

PACIENTES Y MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo, transversal y descriptivo que incluyó un total de 65 mujeres de entre 15 a 46 años originarias en su mayoría de la Ciudad de México y zonas conurbadas del Estado de México, las cuales asistieron al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) Isidro Espinosa de los Reyes ubicado en la Ciudad de México, para cuidado prenatal, resolución del embarazo o atención de problemas ginecológicos, previo consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto con el número de protocolo: 212250-22761. Todas las participantes respondieron un cuestionario acerca de aspectos socio-demográficos.

Muestras. A todas las mujeres se les tomaron dos muestras de exudado cervical. La primera para el estudio de Papanicolaou y la segunda para la genotipificación de VPH. Ésta última se depositó en un vial que contenía medio de transporte Preserv-Cyt Solution (MA, USA) y se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Genotipificación del VPH. Se empleó la prueba in vitro "Linear Array HPV Genotyping Test" (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) para la detección simultánea de hasta 37 genotipos virales, incluyendo trece de alto riesgo (VPH16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) y veinticuatro de bajo riesgo (VPH6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39, CP6108).

De manera resumida el proceso de genotipificación se realizó de la siguiente forma:

1. Extracción y purificación del DNA empleando solución de lisis (con proteinasa K) y columnas de sepharosa.

2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores (PGMY) biotinilados específicos para el gen de la región L1 del genoma del VPH e iniciadores específicos para el gen constitutivo de la β -globina, como control de calidad del DNA. La amplificación se realizó en un volumen final de 100 μ L, conteniendo 50 μ L de la mezcla de reacción, 40 μ L de agua y 10 μ L del DNA purificado, según el siguiente protocolo: incubación inicial a 50°C durante 2 minutos e incubación a 95°C durante 9 min, seguidas por 40 ciclos de amplificación (95°C/30 segundos, 55°C/1 minuto y 72°C/1 minuto) y una extensión final de 72°C durante 10 minutos. En cada corrida se incluyó un testigo negativo y otro positivo.

3. Hibridación. A cada tubo con los productos de amplificación se le agregó solución desnaturante y se incubó una hora a 37°C. Posteriormente esta mezcla se vertió sobre tiras de celulosa conteniendo DNA recombinante de cada uno de los 37 genotipos virales y se dejó interactuar durante 20 min/53°C.

4. Detección de los híbridos. Se realizó mediante revelado colorimétrico sobre las tiras de celulosa.

Análisis estadístico. Se empleó estadística descriptiva para los hallazgos socio-demográficos y para la genotipificación de VPH.

RESULTADOS

El promedio de edad de las mujeres analizadas fue de $28 \pm 8,6$ años, con un intervalo entre 15 y 46 años. La media de inicio de vida sexual activa fue de $19 \pm 4,9$ años, teniendo una mediana de 4 parejas sexuales. En la Tabla I se muestran el resto de variables socio-demográficas.

Se observó una mayor frecuencia de infección por VPH en mujeres con edad superior a los 20 (83%) años, que en mujeres que iniciaron su actividad sexual activa antes de los 20 (69%) años y las que tuvieron más de una (67%) pareja sexual antes del estudio (Figura 1).

Respecto a la genotipificación, en 36 pacientes se logró identificar al menos un genotipo de VPH, de tal manera que la frecuencia total de la infección fue del 55,4%. Entre las pacientes infectadas se identificaron un total de 65 genotipos, de los cuales 19 (29,2%) fueron de alto riesgo y 46 (70,8%) de bajo riesgo.

Los genotipos de alto riesgo identificados con mayor frecuencia, fueron: VPH52 (11,1%) y 51 (8,3%), seguidos de VPH16, 31, 35 y 58 con el 5,6% cada uno. Con relación a los genotipos de bajo riesgo, los más frecuentes fueron: VPH6 (44,4%), 53 (16,7%), 11 y 42 con el 11,1% cada uno (Tabla II).

Por otro lado, 14 (38,9%) mujeres presentaron infección con un solo genotipo, mientras que 22 (61,1%) pacientes estuvieron infectadas simultáneamente con al menos dos o hasta cuatro genotipos diferentes de VPH. El grupo de pacientes infectadas con dos genotipos (47,2%) fue el de mayor predominio, seguido por el grupo de mujeres

Tabla I
VARIABLES SOCIO-DEMOGRÁFICAS DE 36 MUJERES INFECTADAS POR EL VPH

VARIABLES	PACIENTES CON VPH n = 36
Edad (años):	
Promedio \pm DE	27,5 \pm 8,6
Intervalo	15 a 46
≤ 20 años	6 (16,7%)
> 20 años	30 (83,3%)
Inicio de vida sexual (años):	
Promedio \pm DE	19,0 \pm 4,9
≤ 20 años	25 (69,4%)
> 20 años	11 (30,6%)
Parejas sexuales:	
Mediana	2
Intervalo	1 a 20
1	12 (33,3%)
> 1	24 (66,7%)
Escolaridad (años estudio):	
Promedio \pm DE	10 \pm 2,8
≤ 9 años	23 (63,9%)
> 9 años	13 (36,1%)
Estado civil (relación de pareja):	
Estable	18 (50%)
No estable	18 (50%)
Ocupación:	
Remunerada	5 (13,9%)
No remunerada	31 (86,1%)

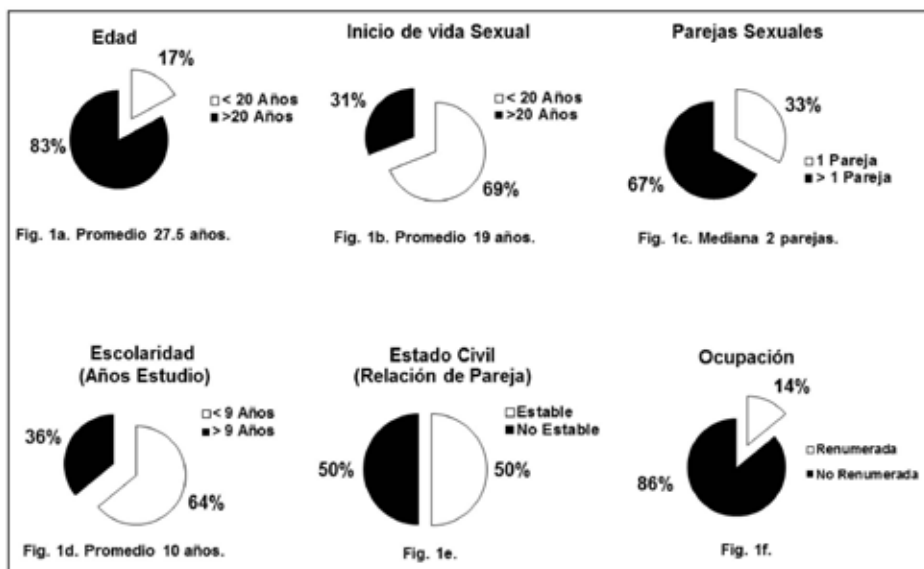


Figura 1. Frecuencia de la infección por VPH (n=36) de acuerdo a las variables socio-demográficas.

Tabla II
DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE VPH MÁS FRECUENTEMENTE IDENTIFICADOS DE ACUERDO A RIESGO ONCOGÉNICO

Genotipos de alto riesgo	n (%)	Genotipos de bajo riesgo	n (%)
52	4 (11,1)	6	16 (44,4)
51	3 (8,3)	53	6 (16,7)
16	2 (5,6)	11	4 (11,1)
31	2 (5,6)	42	4 (11,1)
35	2 (5,6)	55	2 (5,6)
58	2 (5,6)	61	2 (5,6)
33	1 (2,8)	66	2 (5,6)
39	1 (2,8)	84	2 (5,6)
18	1 (2,8)	6108	2 (5,6)
56	1 (2,8)	40	1 (2,8)
		54	1 (2,8)
		62	1 (2,8)
		71	1 (2,8)
		81	1 (2,8)
		83	1 (2,8)
	19 (29,2%)		46 (70,8%)

infectadas con un genotipo (Tabla III). No se identificó una hegemonía particular entre los genotipos de VPH en las pacientes co-infectadas. En todos los casos la combinación de estos, fue específica para cada paciente (Tabla IV).

Con referencia al grupo de mujeres con infección por VPH, 23 (63,9%) se hallaban embarazadas, de ellas 21 (91,3%) se encontraban en el último trimestre del embarazo, mientras que 2 (8,7%) pacientes cursaban el segundo trimestre. El resto (36,1%) no estaban embarazadas.

En las mujeres que cursaban en su tercer trimestre de embarazo se identificaron un total de 39 genotipos de VPH; con presencia de un solo

Tabla IV
DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE VPH DE ALTO Y BAJO RIESGO POR PACIENTE IDENTIFICADOS EN CASOS DE CO-INFECCIÓN

Paciente	Alto riesgo	Bajo riesgo
1	16, 35	-
2	35, 52	-
3	52, 58	-
4	-	6, 53
5	-	6, 55
6	-	6, 6108
7	-	6, 6108
8	-	11, 66
9	-	42, 54
10	-	53, 83
11	-	61, 71
12	18	6
13	33	11
14	39	6
15	51	11
16	52	42
17	56	40
18	-	6, 62, 81
19	16, 51	53
20	31	42, 84
21	31, 51	11, 42
22	52, 58	6, 66
Total de genotipos	19	32

genotipo (9 casos) y con hasta cuatro genotipos diferentes por paciente (12 casos). Este grupo mostró 13 genotipos de alto riesgo y 26 de bajo riesgo. Los genotipos de alto riesgo más frecuentes fueron: VPH31 en tres casos, VPH51 y 16 en dos casos, respectivamente; el resto VPH18, 35, 39, 52, 56 y 58 se identificaron en un solo caso, respectivamente. Por su parte, los genotipos de bajo riesgo más comunes fueron: VPH6 en diez casos, 53 en cuatro casos, 11, 42, 66 y CP6108 en dos casos cada uno y 40, 55, 61 y 84 en un solo caso respectivamente. Con respecto a las 2 pacientes con embarazo en el segundo trimestre, una de ellas presentó dos genotipos de alto riesgo (VPH35 y 52), mientras que en la otra paciente se identificaron VPH6 y 55 que correspondieron a genotipos de bajo riesgo.

Finalmente, los resultados del estudio citológico indicaron que solamente 10/36 (27,8%) pacientes se diagnosticaron con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), el resto del grupo no mostró ningún otro tipo de lesión epitelial. Un total de 19 (29,2%) genotipos fueron identificados en estas mujeres, de

Tabla III
PROPORCIÓN DE MUJERES CON INFECCIÓN ÚNICA Y COINFECCIÓN POR DIFERENTES GENOTIPOS DE VPH

Número de genotipos identificados por paciente	Pacientes infectadas n (%)
1 genotipo	14 (38,9)
2 genotipos	17 (47,2)
3 genotipos	3 (10,3)
4 genotipos	2 (5,6)

ellos 7 correspondieron a genotipos de alto grado (VPH52 y VPH31 en dos casos; VPH35, VPH51 y VPH58 en un caso, respectivamente), mientras que 12 fueron de bajo riesgo (VPH6 en tres casos, VPH11 y VPH53 en dos casos, VPH42, VPH61, VPH66, VPH71 y VPH83 en un caso, respectivamente).

DISCUSIÓN

La infección genital provocada por el VPH y la presencia de otros factores aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer cervicouterino (4,6). La prevalencia de la infección se incrementa notablemente dependiendo de la zona geográfica, la edad de las personas infectadas y la conducta sexual (1,9,10).

En este estudio, mostramos la distribución de diferentes genotipos de VPH identificados en pacientes que acudieron al INPer para su atención gineco-obstétrica, ya sea de seguimiento o para resolución del embarazo, de tal manera que la frecuencia total fue del 55% con una distribución heterogénea de los genotipos oncogénicos y no oncogénicos, acorde con los resultados obtenidos por diversos investigadores (1,9,11).

Con respecto al estudio sociodemográfico, la mayoría de las pacientes tuvo más de una pareja sexual, el inicio de su vida sexual activa fue antes de los 20 años y al momento del estudio las encuestadas mencionaron que no contaban con una pareja estable. En cuanto a su escolaridad, sobresalió que gran parte de ellas tenían menos de 9 años de estudio formal (Tabla I y Figura 1). En este caso, reportes de diversas investigaciones han encontrado una asociación entre las variables antes mencionadas con la adquisición de infección por VPH o el desarrollo de cáncer cervical (12-14). En este estudio no se encontró ninguna relación significativa entre los aspectos sociodemográficos e infección por VPH.

Múltiples estudios han descrito la presencia de diversos genotipos en diferentes poblaciones de México. Colín-Orozco y cols (11) encontraron frecuencias del 14,6 %, 8,2% y 7,9% para genotipos de alto riesgo VPH16, 18 y 58, mientras que los genotipos de bajo riesgo más frecuentes fueron VPH11 y 53. Por su parte, Lazcano-Ponce y cols (9), reportaron frecuencias iguales o menores al 2% para genotipos de alto riesgo VPH16, 31 y 18. En otro reporte, Peralta-Rodríguez y cols (15), en un meta-análisis identificaron VPH16, 58 y 18 como los genotipos más frecuentes en el Oeste del país, para la región Central fueron los genotipos VPH16, 18 y 45, mientras que para la región Sur fueron VPH16, 18 y 31.

En este estudio, la mayoría de las pacientes seleccionadas provenían de la Ciudad de México y

zonas conurbadas del Estado de México. Los tipos virales que más se repitieron en estas mujeres fueron, de alto riesgo VPH52, 51, 31, 35, 58, y 16, y de bajo riesgo VPH6, 53, 11 y 42. En los estudios descritos en el párrafo anterior, los autores emplearon PCR acoplado a secuenciación, o bien técnicas de arreglo en línea para 27 genotipos. Las diferencias en los hallazgos de los diferentes genotipos pudieran ser el resultado de la diversidad en las técnicas de identificación empleadas, las cuales probablemente se enfocan en la detección de genotipos de alto riesgo, sin embargo también se debe considerar la homogeneidad en la toma de la muestra. En este trabajo, empleamos una técnica de arreglo en línea similar al estudio anterior, pero con la diferencia que detecta hasta 37 genotipos. Observamos que los genotipos de alto riesgo VPH16 y VPH18 fueron detectados en menor frecuencia de lo esperado, sobresaliendo otros genotipos oncogénicos poco reportados en otros estudios (1,15-17).

Es claro que en la mayoría de los estudios existen coincidencias entre los genotipos identificados, sin embargo también existen diferencias en cuanto al número de genotipos detectados y en cuanto a sus frecuencias, lo que confirma que la zona geográfica, la edad de las pacientes y la metodología empleada son importantes en la distribución reportada del VPH (15-18).

Cabe destacar que dos terceras partes (61,1%) de las pacientes estudiadas mostraron co-infección con dos y hasta cuatro genotipos diferentes. La mayoría de estas pacientes (59%) tenían combinaciones de genotipos de alto y bajo riesgo. Se ha sugerido que los genotipos de alto y bajo riesgo oncogénico pudieran actuar sinérgicamente, de tal manera que se promueva fácilmente el desarrollo de cáncer cervical, a diferencia de aquellas pacientes infectadas con un solo genotipo (19,20).

La elevada frecuencia de co-infección con genotipos de VPH de alto y bajo riesgo observada en nuestro estudio, sugiere la necesidad de brindar seguimiento a estas mujeres en un futuro a mediano y largo plazo para detectar y prevenir futuras complicaciones.

Por otro lado, se ha descrito una alta correlación entre la presencia de genotipos de alto riesgo y diferentes lesiones cervicales (4,15). Dos estudios realizados en mujeres con lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), con lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) o cáncer cervical, mostraron frecuencias de infección por VPH del 56,4% al 99,1%, independiente del tipo de lesión (17,21). Sin embargo, entre ambos estudios, estas frecuencias variaron, principalmente con relación al genotipo de alto grado identificado; así para VPH58 el primer trabajó informó que el 28,5% de las mujeres infectadas cursaba con algún tipo de lesión, contra solo el 0,7% de las informadas en el segundo estudio.

Para el genotipo VPH16, el primer estudio señaló la presencia de lesiones asociadas en el 25,7% de las mujeres, mientras que el segundo estudio se encontró esta asociación en el 53,4% de los casos estudiados.

En este trabajo, los genotipos de alto riesgo más frecuentes en las pacientes con LIEBG fueron, VPH52, VPH31, VPH35, VPH51 y VPH58. Lo que concuerda con diferentes estudios con relación a la asociación que existe con la presencia de ciertos virus oncogénicos y lesiones epiteliales (15,22).

CONCLUSIONES

Se encontraron frecuencias de VPH16 y 18 por debajo de lo descrito por otros autores, sin embargo otros genotipos de alto riesgo fueron los más comunes.

El 59% de las pacientes mostraron co-infección con diferentes genotipos de VPH y al menos un genotipo de alto riesgo estuvo presente en ellas. Considerando que la distribución de los diferentes tipos de VPH varían geográficamente y que los genotipos oncogénicos son más prevalentes en ciertas regiones, es importante contar con estudios basados en la población para evaluar el comportamiento de la infección, conocer el curso clínico de la enfermedad y definir la eficacia de las vacunas, de esta manera se ayudará a prevenir en parte el cáncer de cuello uterino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ting J, Kruzikas DT, Smith JS. A global review of age-specific and overall prevalence of cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(7):1244-9.
2. Lizano-Soberon MC, Contreras-Paredes A. Infección por virus del papiloma humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología* 2009;4:205-16.
3. Flores YN, Bishai DM, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Lőrincz A, Hernández M, Ferris D, *et al.* Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in México. *Salud Pública Méx* 2008;50(1):49-58.
4. Carter JR, Ding Z, Rose BR. HPV infection and cervical disease: a review. *Aus N Zealand J Obstet Gynaecol* 2011;51:103-8.
5. Magaña-Contreras M, Contreras-Paredes A, Chávez-Blanco A, Lizano M, de la Cruz-Hernández Y, De la Cruz-Hernández E. Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. *J Med Virol* 2015;87(12):2098-105.
6. Muñoz N, Bosch X, San José S, Herrero R, Castellsagué X, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
7. Hernández-Girón C, Smith JS, Lorincz A, *et al.* The prevalence of high-risk HPV infection in pregnant women from Morelos, México. *Salud Pública Méx* 2005;47(6):423-9.
8. Castellsague X, Drudis T, Cañadas MP, Gonce A, Ros R, Pérez JM, *et al.* Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother to child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 2009;9:74-86.
9. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, *et al.* Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91(3):412-20.
10. Chacón J, Sanz I, Rubioli MD, De la Morenac ML, Díaz E, Mateos ML, *et al.* Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(5):311-6.
11. Orozco-Colín A, Carrillo-García A, Méndez-Tenorio A, Ponce-de-León S, Mohar A, Maldonado-Rodríguez R, *et al.* Geographical variation in human papillomavirus prevalence in Mexican women with normal cytology. *Int J Infect Dis* 2010;14(12):e1082-e1087.
12. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002;89(2):191-9.
13. Syrjänen K. New concepts on risk factors of HPV and novel screening strategies for cervical cancer precursors. *Eur J Gynaecol Oncol* 2008;29(3):205-21.
14. Araujo E, Barroso S, Cendón A, Muñoz M; Ortuno M, Cardozo R, *et al.* Infección por virus de papiloma humano en mujeres: hallazgos paraclínicos. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010;70(2):82-9.
15. Peralta-Rodríguez R, Romero-Morelos P, Villegas-Ruiz V, Mendoza-Rodríguez M, Taniguchi-Ponciano K, González-Yebra B, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in the cervical epithelium of Mexican women: meta-analysis. *Infect Agent Cancer* 2012;7(1):34.
16. Calleja-Matías IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, González-Guerrero JF, *et al.* Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and native American variants. *Virology* 2004;319(2):315-23.
17. González-Losa M del R, Rosado-López I, Valdez-González N, Puerto-Solís M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol* 2004;29(3):202-5.
18. Gutiérrez-Xicoténcatl L, Plett-Torres T, Madrid-González CL, Madrid-Marina V. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. *Salud Pública Méx* 2009;51(Suppl 3):S479-88.
19. Gargiulo F, De Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, *et al.* Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007;125(2):176-82.
20. Soto-De Leon S, Camargo M, Sanchez R, Munoz M, Perez-Prados A, Purroy A, *et al.* Distribution patterns of infection with multiple types of human papillomaviruses and their association with risk factor. *PLoS One* 2011;6(2):e14705.
21. López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M. Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2008;3:3.

-
22. Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero LC, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares, Flores-Alfaro E, *et al.* Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol* 2010;117(2):291-6.
-