OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECCIÓN DE ADN REGIÓN LCR Y ONCOPROTEÍNA E6 DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPO 16 Y 18 EN MUESTRAS CERVICALES DE MUJERES CON LESIÓN INTRAEPITELIAL ESCAMOSA DE BAJO GRADO

Bernal Aguirre, Laura Elena; Mendoza Torres, Laura Patricia; Mongelós Dacunte, Pamela Esther

Universidad Nacional de Asunción – Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

---

Introducción

El VPH es un virus de ADN de doble hebra, su genoma posee aproximadamente 8000 pares de bases y en él se diferencian tres regiones:

1. La región reguladora larga (LCR) que posee secuencias que controlan la trascripción y replicación viral (IARC Monographs, 2007).
2. La región temprana E, que codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. La oncoproteína E6 promueve la degradación de p53 y de esta forma inhibe su actividad, mientras que E7 interrumpe la vía de Retinoblastoma dando como resultado una activación descontrolada del ciclo celular (Litwin, Clarke, Dean, & Wentzensen, 2017).
3. Y la región tardía L, que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 las cuales forman la cápside viral y participan en el ensamblaje del ADN viral (Burk et al., 2009; IARC Monographs, 2007).

Actualmente se han descrito más de 150 tipos de VPH, de los cuales aproximadamente 50 infectan la mucosa genital. Los VPH de tropismo mucoso se clasifican en tipos de 'alto riesgo' (VPH-AR) y 'bajo riesgo' (VPH-BR) oncogénico, siendo los de bajo riesgo los causantes de lesiones benignas y los de alto riesgo los causantes de lesiones que pueden progresar a tumores malignos (de Villiers et al., 2004; Graham, 2012; PAHO, 2016; Yar et al., 2016).

Entre los VPH-AR los tipos 16 y 18 son los más frecuentemente detectados en cáncer cervical, con aproximadamente el 50% y 20% de casos, respectivamente (Muñoz et al., 2003).

Las proteínas tempranas E6 y E7 inhiben a supresores del ciclo celular. E6 estimula la degradación de p53, quedando así inhibido el arresto del ciclo celular y la apoptosis; y se produce la proliferación celular descontrolada (Graham, 2012; Yim, 2005).

La progresión a cáncer ocurre en un pequeño porcentaje de mujeres infectadas, ya que la mayoría elimina la infección en 1-2 años (de Sanjosé, 2017).

Los hallazgos citológicos e histológicos de los daños producidos por el virus se clasifican en dos categorías, lesión intraepitelial de bajo grado (LSIL) que incluye a la neoplasia cervical intraepitelial 1 (CIN1); y lesión intraepitelial de alto grado (HSIL) que incluye a CIN 2 y 3. Las lesiones de bajo grado generalmente constituyen una infección por VPH transitoria en las que el virus se mantiene como episoma, mientras que las lesiones de alto grado se asocian a persistencia viral y mayor riesgo de progresión de la lesión ya que el genoma viral se encuentra integrado al cromosoma del huésped (Nayar, 2015; Waxman, 2012).

La infección persistente puede dar lugar a LSIL y ésta conducir a HSIL y cáncer en un promedio de 5 a 14 años si no se detectan y tratan. Es importante el tipo viral, ya que la persistencia viral constituye un factor de riesgo clave para el desarrollo de lesiones de alto grado y cáncer (Burk et al., 2009).

A nivel mundial se registraron aproximadamente 528.000 casos nuevos de cáncer de cuello uterino y 266.000 muertes en 2012 (Ferlay et al., 2012).

En Paraguay un estudio realizado en el año 2012 por Kasamatsu *et al.*, observó en 432 casos de cáncer cervical, una frecuencia de 64,6% de VPH 16, seguido de 8,5% por VPH 18 y 5,4% de VPH 45 (Kasamatsu et al., 2012).

Sin embargo, debido a que la mayoría de pruebas de VPH basadas en ADN tienen un bajo valor predictivo positivo para detección de CIN2 o más, se debe identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar una infección persistente o lesión precursora de cáncer mediante pruebas de triage. Para evitar la sobrecarga al sistema de salud y la carga emocional que representa para la mujer (Ronco et al., 2013).

Estudios han demostrado que mujeres positivas para VPH de alto riesgo (VPH-AR) y con expresión de E6 en cuello uterino poseen mayor riesgo de desarrollar lesiones, y que esta oncoproteína es detectada con mayor frecuencia en mujeres que presentan HSIL o cáncer (Fontecha et al., 2017; Zhang et al., 2017). Por lo tanto, su detección es un buen predictor de riesgo de cáncer. Actualmente se encuentra disponible la prueba OncoE6 Test (Arborvita) que posee una sensibilidad de 67,3% y una especificidad de 98,9% para la detección de CIN3 o más (Cuzick et al., 2012). El procesamiento no requiere un equipamiento complejo, por lo que se podría aplicar efectivamente en regiones con bajos recursos. Además de su bajo costo, la realización requiere relativamente poco tiempo y la interpretación de resultados es fácil. (Pan American Health Organization, 2016).

Debido a esto, el presente estudio busca optimizar estas pruebas de triage con miras a su implementación en servicios de salud. Con el fin de orientar el manejo clínico de mujeres con LSIL, ya que esto servirá de base a un posterior estudio de seguimiento a fin de analizar

la relación entre positividad para la oncoproteína E6 y progresión de lesión (Qiao et al., 2013).

Objetivos

Objetivo General

Optimizar métodos moleculares para la detección de ADN de la región LCR y oncoproteína E6 de virus de papiloma humano tipo 16 y 18 en muestras cervicales de mujeres con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado.

Objetivos específicos

1. Determinar la concentración óptima de $MgCl_2$, la temperatura de alineamiento óptima y el límite de detección de las PCR para VPH 16 y VPH 18.
2. Optimizar una técnica inmunocromatográfica para la detección de la oncoproteína E6 de VPH 16 y VPH 18.

Materiales y Métodos

Optimización de PCR para VPH 16 y VPH 18

Para la optimización de las PCR se utilizaron controles positivos de VPH 16 y VPH 18 provenientes de biobanco del Departamento de Salud Pública (IICS-UNA), previamente tipificadas en estudios anteriores (14INVO36, P11/2010).

La detección del genoma de VPH 16 y VPH 18 se realizó amplificando un fragmento de la región LCR de controles positivos a través de reacciones de PCR descriptas por Ho *et al.* en 1991 para VPH 16, y Ong *et al*. en 1993 para la detección de VPH 18. Se utilizaron primers 16a/16b para VPH 16, y 18a/18b para VPH 18, los cuales amplifican un fragmento de 364 pares de bases y 320 pares de bases, respectivamente (Ho et al., 1991; Ong et al., 1993).

La presencia del genoma del VPH se visualizó por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata según el protocolo establecido por Sanguinetti *et al.* En cada corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular 50 pares de bases (ThermoScientific, USA) (Sanguinetti, 1994).

Bajo estas condiciones se probó la reacción a tres concentraciones distintas de $MgCl_2$: a 1,5mM; 2,0mM y 2,5mM. Para determinar la temperatura de alineamiento, se probó la reacción a 60 y 65°C.

Posterior a la optimización de las PCR se determinó el límite de detección de las reacciones utilizando un control positivo de VPH 16 de 14,6ng/µL y un control positivo de VPH 18 de 21,7ng/µL. Se prepararon diluciones seriadas con factor de dilución de 10. Se seleccionaron las diluciones de 10^{-5} a 10^{-12} y de 10^{-6} a 10^{-13} a fin de determinar hasta que título es detectable el genoma viral.

Todas las diluciones de los controles fueron sometidas a PCR por triplicado y posterior electroforesis. Se obtuvieron tres geles mediante los cuales determinó el límite de detección para cada tipo de VPH, concordando al menos dos de ellos en la última dilución en la que se detectó producto.

Optimización de una técnica inmunocromatográfica para la detección de oncoproteína E6 de VPH 16 y VPH 18

La optimización se realizó utilizando el kit OncoE6TM Cervical Test HPV16/HPV18 (Arborvita, USA), consistente en una prueba de flujo lateral que detecta E6 a partir de lisados obtenidos de hisopo de dacrón o Preservcyt (medio líquido de transporte). La muestra reacciona con anticuerpos específicos para E6 de los tipos 16 y 18, conjugados con fosfatasa alcalina. Ante la presencia de E6 de alguno de los dos tipos, se forma un complejo ternario visible tras el agregado del sustrato.

Se utilizaron como controles una muestra con diagnóstico anatomopatológico de CIN3 positiva para VPH 16 y VPH 18 (A1) y una muestra con diagnóstico de cáncer cervical positiva para VPH 16 (B2), ambas provenientes del biobanco del Departamento de Salud Pública (IICS-UNA), tipificadas previamente en trabajos anteriores (14INVO36). En ambos casos se utilizó la muestra tomada del cuello uterino con hisopo de dacrón y la muestra del cepillado de cuello uterino colectada en medio Preservcyt. También se utilizó el control positivo (CP) proveído con el kit.

Primeramente, se llevó a cabo una lisis y extracción de la oncoproteína E6, luego del acondicionamiento y clarificación del lisado, se procedió a agregar el lisado al enhancer. Tras una incubación, la tira inmunocromatográfica se puso en contacto con el lisado y se esperó un tiempo de corrida. Posterior a esto se realizó un lavado e incubación, y luego se agregó la solución de desarrollo y se esperó un tiempo de desarrollo.

En relación al tiempo de desarrollo, se determinó en dos tiempos diferentes, a 15 y 20 minutos, para analizar en qué manera afecta a la intensidad de la banda observada.

Posterior al agregado de la solución de desarrollo, se realizó la lectura de resultados hasta 3 minutos. Un resultado se consideró positivo ante la presencia de bandas del control interno positivo y la banda oncoproteína E6 16 (HPV16) ó la banda del control interno positivo y la banda oncoproteína E6 18 (HPV18).

Detección de VPH 16 y 18 y oncoproteína E6 utilizando las técnicas optimizadas

Se colectaron 9 muestras cervicales de mujeres de 30 a 64 años con resultados de citología convencional de LSIL provenientes del Hospital Nacional de Itauguá (HNI) y del Instituto de Previsión Social (IPS).

Las dos muestras cervicales fueron tomadas por una ginecóloga (un cepillado de cuello uterino y un hisopado con dacrón), en los locales de trabajo utilizando materiales estériles y descartables para cada mujer. Una vez tomadas las muestras, los cepillados fueron colocados en un medio de transporte (Preservcyt) y los dacrones en un tubo eppendorf seco que fueron posteriormente almacenados a -80°C hasta su procesamiento. El cepillado se tomó para realizar la detección de ADN VPH 16 y 18, y las dos muestras para realizar la detección de onco E6 en mujeres positivas para ADN VPH 16 y/o 18.

Extracción de ADN viral: Se utilizó un kit comercial AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Tipificación de muestras: Las muestras de ADN extraídas que dieron resultado positivo para detección de β-globina fueron sometidas a la PCR optimizada utilizando los cebadores específicos para la detección de VPH 16 y VPH 18 descriptos anteriormente; y se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción de nitrato de plata según Sanguinetti et al (Ho et al., 1991; Ong et al., 1993).

Análisis estadístico: se realizó utilizando procedimientos de analítica descriptiva, para determinar las frecuencias de VPH 16 y 18, así como de la oncoproteína E6 utilizando el programa EpiInfo (CDC, Atlanta).

Consideraciones éticas: Para todas las muestras colectadas se presentó un consentimiento informado. Todas las muestras se mantuvieron anónimas bajo un código de identificación, tanto las provenientes del Hospital Nacional de Itauguá como las del Instituto de Previsión Social.

Resultados y Discusión

Optimización de PCR para VPH 16 y VPH 18

En relación a la concentración de $MgCl_2$, para el control VPH 16 puro se observaron bandas a las tres concentraciones analizadas. Con el control 1:100 solo se observaron bandas a 2 y 2,5mM. Sin embargo, se optó por utilizar la concentración final de 2mM ya que se obtuvieron bandas nítidas tanto con el control puro como diluido.

Para el control VPH 18 puro se observaron bandas a 2 y 2,5mM, mientras que el control diluido solo presentó banda a 2,0mM. Por lo tanto, se optó por utilizar la concentración final de 2mM. Estas concentraciones difieren de la reportada por Tornesello *et al.* (Tornesello et al., 2000), en el que utilizan 2,5mM para VPH 16. Mientras que Arias-pulido *et al.* (Arias-pulido et al., 2005) reportan 2,5mM en la amplificación de VPH 18.

En cuanto a la temperatura de alineamiento, se probaron las reacciones a 60°C y 65°C. para

la primera temperatura analizada se observaron bandas nítidas de ambos controles positivos. Mientras que a 65°C solo se visualizó una banda tenue correspondiente al control VPH 16 puro. En base a esto se optó por la temperatura de 60°C. Estos resultados concuerdan con la temperatura de alineamiento calculada en base al porcentaje de G+C y A+T de los primers, la cual fue de 61°C para VPH 16 y de 57°C para VPH 18 ("Tm Calculator. Thermo Fisher Scientific"). Sin embargo, Tornesello *et al.* reportaron 55°C para VPH 16 (Tornesello et al., 2000), y Arias-pulido *et al.* 58°C para VPH 18 (Arias-pulido et al., 2005).

En relación al límite de detección para VPH 16, en la Figura 1 se observa un resultado positivo hasta la dilución 10^{-11}, es decir, hasta 14,6x10^{-11}ng/µL.

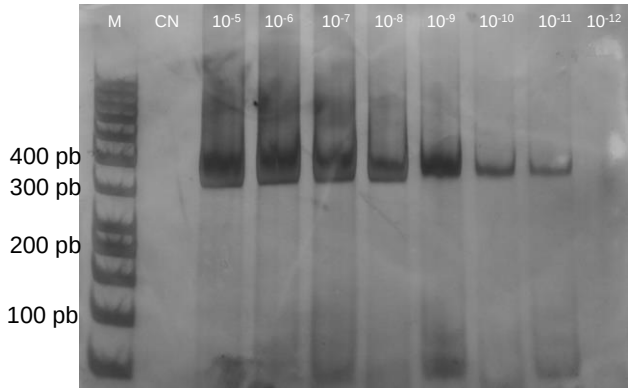


Figura 1 Límite de detección para PCR VPH 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la región LCR de VPH 16. Carril (M) Marcador de 50 pares de bases, (CN) Control Negativo. Carriles 3 al 10: diluciones del control positivo de VPH 16 desde 10^{-5} al 10^{-12}.

Mientras que para el control VPH 18, se observó resultado positivo hasta la dilución 10^{-12}, es decir hasta 21,7x10^{-12}ng/µL. Estos resultados se aprecian en la Figura 2. Estos resultados difieren de lo que reportan otros autores como Chow *et al.* (Chow, 1990) que obtuvieron un límite de detección de al menos 0,01 µg de ADN genómico de líneas celulares Si-Ha (VPH16) y C4-1 (VPH18). Lo que sugiere que las reacciones son capaces de detectar pequeñas cantidades de ADN viral y las diferencias en estos resultados pudieron deberse a las condiciones diferentes en que fue determinado el límite de detección.

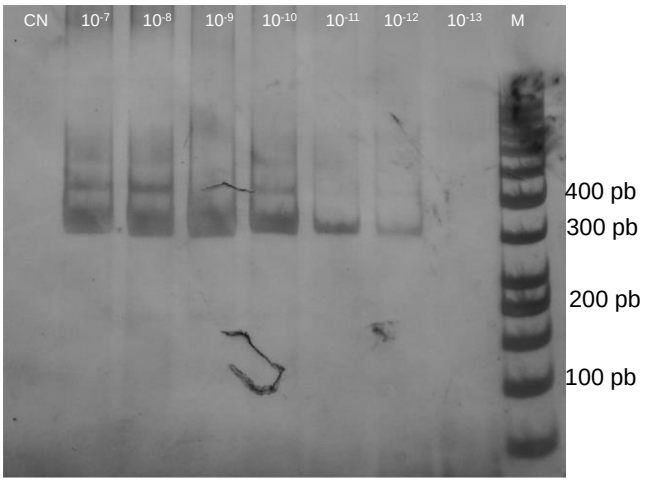


Figura 2 Límite de deteccion para PCR VPH 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la region LCR de VPH 18. Carril (CN) Control Negativo. Carriles 2 al 9: diluciones del control positivo de VPH 18 desde 10^{-7} al $10^{-13.}$. (M) Marcador de 50 pares de bases.

En la Tabla 1 se encuentran resumidas las condiciones de PCR optimizadas.

Tabla 1. Condiciones de PCR optimizadas

	VPH 16	**VPH 18**
Concentración de $MgCl_2$ (mM)	2	2
Temperatura de Alineamiento (°C)	60	60
Límite de detección	10^{-11}	10^{-12}

Optimización de una técnica inmunocromatográfica para la detección de oncoproteína E6 de VPH 16 y VPH 18

Para determinar el tiempo de desarrollo, se probó la reacción con el hisopo de dacrón de los controles A1 y B2; además del control positivo del Kit (CP), a los 15 y 20 minutos. Se optó por 20 minutos a 23°C ya que se mejoró la visualización de las bandas. En la Figura 3 se observa a la izquierda los resultados a los 15 minutos, y a la derecha los resultados a los 20 minutos.

A los 15 minutos el carril de A1 presenta, una banda de VPH 16 con intensidad 3 y la banda del control interno con intensidad 5. El control B2 presenta banda de VPH 16 con intensidad 5 y la banda del control interno con intensidad 5. En el carril de CP se observan la banda de VPH 16, VPH 18 y control interno con intensidad 5.

A los 20 minutos, se observa la banda de VPH 18 del carril A1 con intensidad 1, así como

las bandas de VPH 16 intensidad 4 y el control interno. En el carril B2 y el carril CP se aprecian las bandas con las mismas intensidades. Por tanto, el tiempo de desarrollo seleccionado fue de 20 minutos a 23°C ya que así se mejoró la visualización de las bandas.

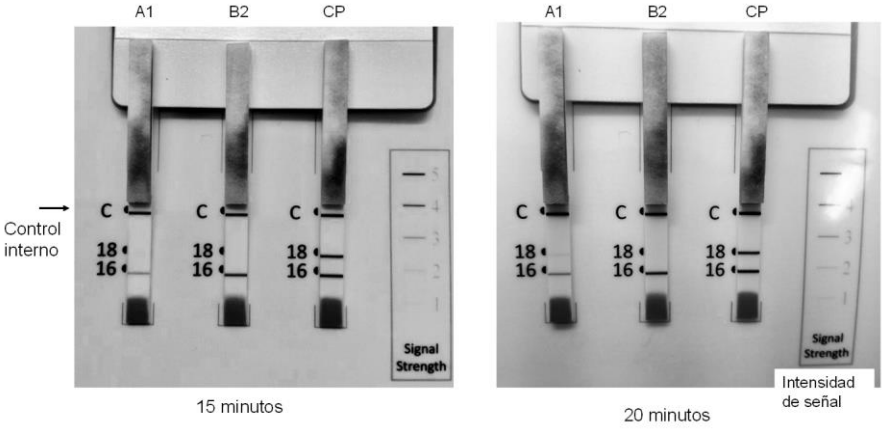


Figura 3 Corrida inmunocromatografica del hisopo de dacrón. Carril A1: Control positivo VPH 16 y VPH 18. Carril B2: Control positivo VPH 16. Carril CP: Control Positivo proveído.

Para los controles A1 y B2 obtenidos del Preservcyt, además del control positivo (CP) se optó por un tiempo de desarrollo de 20 minutos, por lo expuesto anteriormente. Para A1 se observó una banda tenue de VPH 16 con intensidad 1. Para B2 se observó una banda tenue de VPH 16 de intensidad 1. El control positivo presento las tres bandas con alta intensidad. Estos resultados se aprecian en la Figura 4. Las corridas son válidas ya que en todas se visualizó la banda del control interno.

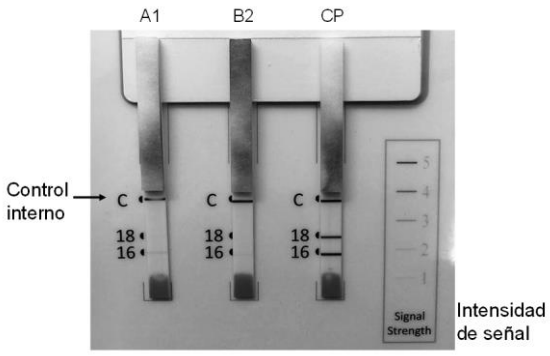


Figura 4 Corrida inmunocromatográfica del Preservcyt. Carril A1: Control positivo VPH 16 y VPH 18. Carril B2: Control positivo VPH 16. Carril CP: Control Positivo proveído.

En cuanto a la corrida de A1 y B2 tomadas del Preservcyt, las bandas que se observaron presentaron menor intensidad que las observadas con hisopo de dacrón. Esto podría

deberse a que con el hisopo la detección se realiza directamente del material, a diferencia del Preservcyt en el cual la muestra se encuentra diluida en un volumen de 20mL. Habría que evaluar los resultados de un mayor número de muestras a fin de analizar con mayor solidez el desempeño de esta técnica para la detección de oncoproteínas E6 a partir del Preservcyt.

Detección de VPH 16 y 18 y oncoproteína E6 utilizando las técnicas optimizadas

Las mujeres participantes pertenecieron a diferentes zonas geográficas del país, del departamento Central, Cordillera, Concepción y Paraguarí.

De las 9 muestras cervicales provenientes del HNI y del IPS, 7 resultaron positivas para el control interno β-globina humana y solo éstas se sometieron a la tipificación, resultando negativas tanto para VPH 16 como VPH 18. En el estudio de Mendoza *et al.* (Mendoza et al., 2011), se observó una frecuencia del 19,5% para VPH 16, 9,1% para VPH 18 en mujeres con LSIL, mientras que en mujeres con HSIL se observó un 41,9% de VPH 16, 14,9% de VPH 31. Por lo tanto, sería conveniente aumentar el número de muestra a fin de obtener resultados más concluyentes.

Conclusión

La concentración óptima de $MgCl_2$ para la detección de VPH 16 y 18 por PCR convencional fue de 2mM para ambas reacciones. La temperatura de alineamiento óptima fue de 60°C para ambas reacciones. Se observó un límite de detección de $14,6x10^{-11}$ng/µL y $21,7x10^{-12}$ng/µL para la PCR de VPH 16 y VPH 18, respectivamente.

Se optimizaron las condiciones para la detección de la oncoproteína E6 de VPH 16 y VPH 18, utilizando como tiempo de desarrollo 20 minutos a 23°C.

No se observó infección por VPH 16 ni VPH 18 en las 7 muestras cervicales de mujeres con lesión escamosa intraepitelial positivas para β-globina humana, por lo cual no se procedió a realizar la prueba de detección de oncoproteína E6.

La detección de E6 es una prueba de bajo costo y fácil interpretación que podría ser utilizada como prueba de triage debido a su elevada especificidad en complemento a la prueba de tamizaje primario. Ambas pruebas servirán para aplicarlas en futuros estudios de seguimiento incluyendo un mayor número de mujeres a fin de aportar datos para el mejor manejo clínico de mujeres positivas para VPH-AR, evaluando su desempeño para identificar a las que poseen más riesgo de tener infección persistente y progresión de lesión.

Bibliografía

Arias-pulido, H., Peyton, C. L., Torrez-martı, N., Anderson, D. N., & Wheeler, C. M. (2005). Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by

sequence analysis of LCR-E6 , *338*, 22–34.

Burk, R. D., Chen, Z., & Van Doorslaer, K. (2009). Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*, *12*(5–6), 281–290.

Chinchai, T., Chansaenroj, J., Swangvaree, S., Junyangdikul, P., & Poovorawan, Y. (2012). Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, *22*(6), 1063–1068. https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318259d904

Chow, V. T. K., Tham, K. M., & Bernard, H. U. (1990). Thermus aquaticus DNA polymerase-catalysed chain reaction for the detection of human papillomaviruses, *27*, 101–112.

Cuzick, J., Bergeron, C., von Knebel Doeberitz, M., Gravitt, P., Jeronimo, J., Lorincz, A. T., … Szarewski, A. (2012). New technologies and procedures for cervical cancer screening. *Vaccine*. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.088

de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2017). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17–27. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., … Bray, F. (2012). GLOBOCAN 2012 v1.0. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*, 4. https://doi.org/223

Fontecha, N., Nieto, M. C., Andía, D., Cisterna, R., & Basaras, M. (2017). RNA extraction method is crucial for human papillomavirus E6/E7 oncogenes detection. *Virology Journal*, *14*(1), 50. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0720-x

Graham, S. V. (2012). Europe PMC Funders Group Human papillomavirus : gene expression , regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies, *5*(10), 1493–1506. https://doi.org/10.2217/fmb.10.107.Human

Ho, L., Chan, S. Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S. K., Villa, L. L., & Bernard, H. U. (1991). Sequence Variants of Human Papillomavirus Type-16 in Clinical-Samples Permit Verification and Extension of Epidemiologic Studies and Construction of a Phylogenetic Tree. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(9), 1765–1772.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2007). *Human Papillomaviruses*.

Kasamatsu, E., Cubilla, A. L., Alemany, L., Chaux, A., Tous, S., Mendoza, L., … Bosch, F. X. (2012). Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in

Paraguay. A study of 432 cases. *Journal of Medical Virology*, *84*(10), 1628–1635. https://doi.org/10.1002/jmv.23373

Litwin, T., Clarke, M., Dean, M., & Wentzensen, N. (2017). Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*, *9*(12), 206. https://doi.org/10.3390/v9080206

Mendoza, L. P., Arbiza, J., Paez, M., Kasamatsu, E., Castro, A., Giménez, G., … Picconi, M. A. (2011). Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *Journal of Medical Virology*, *83*(8), 1351–1357. https://doi.org/10.1002/jmv.22112

Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellasagué, X., Shah, K. V, & Snijders, P. J. F. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 518–527.

Nayar, R., & Wilbur, D. C. (2015). The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathology*, *123*(5), 271–281. https://doi.org/10.1002/cncy.21521

Ong, C. K., Chan, S. Y., Campo, M. S., Fujinaga, K., Mavromara-Nazos, P., Labropoulou, V., … Villa, L. L. (1993). Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *Journal of Virology*, *67*(11), 6424–6431.

Pan American Health Organization. (2016). *Integrating HPV Testing in Cervical Cancer Screening Programs*. Washington, D.C.

Qiao, Y., Jeronimo, J., Zhao, F., Schweizer, J., Chen, W., Valdez, M., … Castle, P. E. (2013). Lower cost strategies for triage of human papillomavirus DNA-positive women. *International Journal of Cancer*, *134*(12), 2891–2901. https://doi.org/10.1002/ijc.28616

Ronco, G., Dillner, J., Elfstrom, M., Tunesi, S., Snijders, P., & Arbyn, M. (2013). Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*, *383*(13), 524–532. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62218-7

Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*, *17*(5), 914–921. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840973

Tm Calculator. Thermo Fisher Scientific. (n.d.). Retrieved from https://www.thermofisher.com/py/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html

Tornesello, M. L., Buonaguro, F. M., Buonaguro, L., Salatiello, I., Beth-Giraldo, E., & Giraldo,

G. (2000). Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *Journal of General Virology*, *81*(12), 2969–2982. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2969

Waxman, A. G., Chelmow, D., Darragh, T. M., Lawson, H., & Moscicki, A.-B. (2012). Revised Terminology for Cervical Histopathology and Its Implications for Management of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix HHS Public Access. *Obstet Gynecol. Obstet Gynecol*, *120*(6), 1465–1471. https://doi.org/http://10.1097/AOG.0b013e31827001d5

Yar, D. D., Salifu, S. P., Darko, S. N., Annan, A. A., Gyimah, A. A., Buabeng, K. O., & Owusu-Dabo, E. (2016). Genotypic characterisation of human papillomavirus infections among persons living with HIV infection; a case-control study in Kumasi, Ghana. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, *21*(2), 275–282. https://doi.org/10.1111/tmi.12645

Yim, E.-K., & Park, J.-S. (2005). The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment*, *37*(6), 319. https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.6.319

Zhang, Q., Dong, L., Hu, S., Feng, R., Zhang, X., Pan, Q., … Zhao, F. (2017). Risk stratification and long-term risk prediction of E6 oncoprotein in a prospective screening cohort in China. *International Journal of Cancer*, *141*(6), 1110–1119. https://doi.org/10.1002/ijc.30807