

Caracterización clínica e histopatológica de la infección por Papiloma Virus humano de muestras de cérvix. Hospital Teodoro Maldonado Carbo “IESS”

César, Bedoya^{1,2}; Sunny, Sánchez-Giler³; Dolores, Zambrano⁴; Alan, Herrera⁴; Alba, Silva⁴; Cristina, Kuon-Yeng⁴; Emilio, Feliz⁴; Carlos, Vera⁴; Belén, Mateo⁴; Doménica, Sotomayor⁴; Juan- Pablo, Murillo⁴; Denisse, Marriot⁴; Kerly, Cevallos⁴; Maylen, Espinosa¹; Karol, España¹.

Resumen

El Virus del Papiloma Humano (HPV), posee una predilección por los tejidos poliestratificados, con persistencia en capas basales, de allí que a partir de ello es el agente etiológico del cáncer de cérvix, principalmente. Este tipo de cáncer es el segundo más frecuente en mujeres, alrededor del mundo. El HPV es único agente infeccioso oncogénico que lo provoca. Se realizó un trabajo para determinar la prevalencia del virus en mujeres, utilizando técnicas de detección de ADN mediante PCR, en tiempo real, a partir de biopsia de cérvix, además de establecer las características histopatológicas y clínicas relacionadas. La prevalencia fue del 30,67%, la presentación histopatológica más frecuentemente infectada fue el Cáncer de cérvix y el in situ. Mientras más displásica es la histopatología del cérvix, más frecuente es la presentación del virus. Se demostró una asociación entre la exposición a la infección y la presencia de secreción vaginal blanquecina y la dispareunia.

Palabras Clave: Cáncer; cérvix; dispareunia; gen L1; Papiloma Humano; regiones conservadas.

Histopathological and clinical characterization of Human Papilloma Virus infection in cervical samples. Teodoro Maldonado Carbo “IESS”

Abstract

Human Papilloma Virus (HPV) has a predilection for poly-stratified tissues, with persistence in the basal layers, hence mainly is the etiological agent of cervical cancer. Cervical cancer is the second most common cancer in women worldwide. HPV is unique oncogenic infectious agent that causes it. The objective of the study was to determine the prevalence of the virus in women, using DNA detection techniques through PCR, in real-time, from the cervical biopsy. In addition, the related histopathological and clinical characteristics were established. The prevalence was 30.67%, the most frequently infected histopathology presentation was cervical and in situ cancer. The more dysplastic the histopathology of the cervix, the more frequent the presentation of the virus. An association between exposure to infection and the presence of whitish vaginal discharge and dyspareunia was demonstrated.

Keywords: cancer; cervix; dyspareunia; L1 gene; Human Papilloma Virus; conserved regions.

Recibido: 31 de mayo de 2016
Aceptado: 28 de abril de 2017

¹ Investigadores, Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública, INSPI, Dirección de Investigación, Desarrollo e Innovación, Julián Coronel 905 y Esmeraldas, Guayaquil, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, FCV, Laboratorio de Biomedicina, Campus Gustavo Galindo, Km. 30,5 vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.

³ Docente de la Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador. Correspondencia: Km 2,5 Vía a Samborondón, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina. Universidad Espíritu Santo. Correo electrónico: sunsanchez@uees.edu.ec -http://orcid.org/0000-0003-2867-013X

⁴ Investigadores Junior. Universidad Espíritu Santo-Ecuador, Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Medicina.

I. INTRODUCCIÓN

El Virus del Papiloma Humano (HPV) pertenece a la familia Papilomaviridae, género alfa; posee un genoma de ADN de doble cadena circular, que codifica para 9 genes: E1-E7 (early o tempranas), L1 y L2 (late o tardías) y región de control o LCR. Dos grupos son importantes, los que codifican para regiones muy conservadas: E1, E2, L1 y L2 que permiten identificar los virus independientemente de sus polimorfismos mediante técnicas moleculares; el segundo grupo representado por E6 y E7, codifican proteínas que le sirven al virus para inmortalizarse e inducir la transformación celular, lo que finalmente provoca células neoplásicas y el cáncer (Spencer Eugenio & Ferrés Marcela, 2011) (Santos-Lopez, Marquez-Dominguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

HPV tiene predilección por los tejidos poliestratificados con persistencia en capas basales. Por ello, es el principal agente etiológico del cáncer de cérvix, el segundo cáncer más frecuente en mujeres alrededor del mundo (Hutter & Decker, 2016). La incidencia de cáncer de cérvix en las Américas es de 83 195 casos registrados en el informe del Institut Català d'Oncologia al 15 de enero de 2014, siendo la cuarta causa de cáncer más frecuente en mujeres y el segundo más común entre las mujeres de 15-44 años. En Sudamérica representa el segundo cáncer más frecuente en mujeres y en aquellas entre 15-44 años. En este mismo reporte, Ecuador registra 2094 casos, con una tasa cruda de 28,2 por cada 100 000 mujeres por año (De Sanjosé et al., 2012).

Las técnicas de screening del cáncer de cérvix pueden ser: inspección visual con ácido acético (VIA), que posee una especificidad del 82% (64-98%) y sensibilidad del 84% (66-96%), con una alta tasa de falsos positivos; frotis o citología cervical con Papanicolaou, pero con este método los diagnósticos citológicos e histológicos sólo poseen una concordancia del 50% de los casos, presentando una sensibilidad del 78% (30-87%) y especificidad del 62% (61-94%) (Soost, Lange, Lehmacher, & Ruffing-Kullmann, 1991).

Las técnicas de detección de HPV disponibles, se clasifican en dos grupos: los que reportan la presencia de grupos de alto riesgo, sin especificar qué grupo/genotipo; y los que reportan los tipos

16 y 18, mayormente asociados con alto riesgo de neoplasia, a través de la detección de ADN, ARN y de los marcadores del virus que inducen la transformación maligna. Las muestras que utilizan son obtenidas a partir de hisopado o cepillado cervical. Métodos para detectar el virus en cáncer de cabeza y cuello, ano o pene no están aprobados aún por la FDA (Goodman, 2015).

El presente trabajo busca determinar la prevalencia del virus en mujeres de 18 años en adelante, utilizando técnicas de detección de ADN mediante PCR, en tiempo real, además de establecer las características histopatológicas y clínicas relacionadas.

II. DESARROLLO

1. Metodología

Se realizó un estudio transversal, observacional, retrospectivo, de prevalencia, en el Hospital Teodoro Maldonado Carbo "IESS", ubicado en Guayaquil, Ecuador, a partir de muestras recolectadas durante el año 2014. Esta unidad hospitalaria recibe una gran cantidad de pacientes de varios estratos socio-económicos, pues pertenece a la red de salud estatal y además, existe la obligatoriedad en el país de integrarse al sistema de seguro de salud que cubre esta institución. El estudio fue aprobado por el comité de bioética COBI-IRB-1.

Todos los procedimientos fueron realizados en los laboratorios de Microbiología y de Biología Molecular de la Escuela de Medicina de la Universidad Espíritu Santo, de Guayaquil, Ecuador.

El Universo estuvo conformado por todas las mujeres con vida sexual activa que acudieron a realizarse una biopsia de cérvix, ordenada por su médico, como parte de su programa de prevención del cáncer de cérvix, durante el período Enero a Junio de 2014.

Los criterios de inclusión fueron:

- Edad: 18 años en adelante.
- Vida sexual activa.
- Muestras provenientes de este Hospital, durante el período de estudio.
- Datos clínicos y epidemiológicos disponibles en su mayoría.

El criterio de exclusión de este trabajo fue:

- Muestra inadecuada y/o insuficiente para los procesamientos.
- Amplificación negativa para beta globina.

1.1. Obtención de las muestras y datos

Se recolectaron todas las biopsias de cérvix embebidas en parafina, a partir del Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital, que ingresaron durante los meses de Enero a Junio del año 2014, previa autorización de las Autoridades de docencia y del Laboratorio. Se tomaron además los datos clínicos y epidemiológicos disponibles en el sistema informático de la Institución, los cuales fueron llenados en una ficha, que luego fue ingresada en una base de datos de Excel.

1.2. Cortes histológicos

A partir de cada bloque de parafina se realizaron dos tipos de cortes, uno que era utilizado para la extracción de ADN y el segundo, que era para la tinción de Papanicolaou.

Para la extracción se realizaron 8 a 10 cortes de más de 10 μm de grosor, los cuales fueron introducidos en un tubo de Eppendorf® de 1,7 uL. Por cada bloque de parafina, se obtuvieron 2 tubos.

Para la tinción se obtuvieron 2 cortes de 4-6 μm de grosor, los cuales fueron colocados en sendas placas porta objetos de vidrio para posterior procesamiento.

1.3. Tinción de Papanicolaou

Por cada bloque de parafina se procesaron dos placas, las cuales fueron sometidas primero a desparafinación e hidratación con Xilol y etanol en grado descendiente. Posteriormente lavadas con agua destilada por 2-3 ocasiones; seguidas de inmersión en Hematoxilina por 5 minutos, lavado y decoloración con alcohol-ácido; luego sumergidas en agua de amonio, lavadas y sometidas a la eosina. Finalmente se introdujeron en etanol en grado ascendiente y en Xilol.

1.4. Extracción de ADN

Para este procedimiento se utilizó el kit comercial QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, de Qiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.5. Observación de las placas

Todas las placas fueron observadas mediante microscopía óptica, en Microscopio OlympusCX31, utilizando los objetivos 10X y 40X. Se utilizó la clasificación propuesta por Richart (Nueva York), en 1967 de Neoplasia Intraepitelial cervical (3 grados), carcinoma in situ y cáncer de cérvix, para el diagnóstico histológico de las muestras (Richart, 1969; Richart, 1973)

1.6. Detección molecular del virus

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando los cebadores universales MY09 y MY11, a concentración final por reacción de 0,2 μM . Estos amplifican la región/gen altamente conservada L1 del virus (Lee, Vigliotti, Vigliotti, & Jones, 2014; Qu et al., 1997). Se utilizó además mezcla pre mix GoTaq® qPCR Master Mix, con marcaje Sybr a concentración 1X. Se añadió agua ultra pura hasta completar volumen total de 15 μL . Se usaron 5 μL de ADN de muestra, a una concentración de 100 ng.

La amplificación se realizó en el termociclador Mastercycler Eppendorf Realplex con el software Eppenforrealplex 2.2., utilizando el programa: 95 °C, 2 min; 95°C, 1 min, 57°C, 1 min, 60°C, 1 min 40 ciclos; 95°C, 15 seg; para la curva de melting: 40°C, 60 seg, 97°C, 1 seg, por 20min. Para cada corrida se utilizaron controles positivos y negativos, además de un control interno de cada muestra mediante la amplificación de la beta globina.

2. Resultados

Se obtuvieron 135 bloques con biopsias de tejidos de cérvix, embebidos en parafina. De éstas muestras, 75 cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, el resto no pudieron ser procesadas por la mala calidad del tejido y la escasa cantidad de muestra. Sin embargo, dos muestras no presentaban la edad de la paciente, y una muestra no mostraba las características clínicas del individuo.

La presencia del virus del Papiloma Humano fue detectada mediante PCR en 23 muestras, lo que corresponde al 30,67%. La distribución de las características histopatológicas y clínicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínica e histopatológicas de Papiloma Virus Humano.

Variable	Muestra		HPV +		HPV -	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Grupo Etario						
0-20 años	3	4,11%	0	0,00%	3	100,00%
21-30 años	24	32,88%	5	20,83%	19	79,17%
31-40 años	22	30,14%	7	31,82%	15	68,18%
41-50 años	16	21,92%	5	31,25%	11	68,75%
51-60 años	3	4,11%	2	66,67%	1	33,33%
61-70 años	4	5,48%	2	50,00%	2	50,00%
71-80 años	1	1,37%	1	100,00%	0	0,00%
Total	73	100,00%	22	30,14%	51	69,86%
Diagnóstico histopatológico						
NIC I	57	76,00%	15	26,32%	42	73,68%
NIC II	6	8,00%	2	33,33%	4	66,67%
NIC III	3	4,00%	1	33,33%	2	66,67%
CIS	5	6,67%	3	60,00%	2	40,00%
CAC	4	5,33%	2	50,00%	2	50,00%
Total	75	100,00%	23	30,67%	52	69,33%
Secreción vaginal						
Blanquecina	37	50,00%	13	35,14%	24	64,86%
Acuosa	15	20,27%	4	26,67%	11	73,33%
Sanguinolenta	4	5,41%	1	25,00%	3	75,00%
Maloliente	10	13,51%	2	20,00%	8	80,00%
Sangrado vaginal	4	5,41%	1	25,00%	3	75,00%
Muestra total	74					
Otras manifestaciones clínicas						
Fatiga	32	43,24%	9	28,13%	23	71,88%
Pérdida de peso	20	27,03%	6	30,00%	14	70,00%
Anemia	37	50,00%	10	27,03%	27	72,97%
Dispareunia	8	10,81%	3	37,50%	5	62,50%
Hematuria	9	12,16%	1	11,11%	8	88,89%
Incontinencia urinaria	16	21,62%	4	25,00%	12	75,00%
Sangrado rectal	3	4,05%	0	0,00%	3	100,00%
Dolor mi	14	18,92%	5	35,71%	9	64,29%
Muestra total	74					

*Variables clínicas no son excluyentes; pacientes presentan más de una.

Además, se realizaron estadísticas de asociación, para determinar si existe relación entre la presencia del virus y la expresión de las características histopatológicas y clínicas. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Medidas de frecuencia, asociación e impacto potencial de las características clínicas de los pacientes del estudio.

Variable de estudio	Penfexp	RP	χ^2	z _{mh}
Sangrado vaginal	-	-	-	10,05
Secreción vaginal blanquecina	56,52	1,22*	-	7,08
Secreción vaginal acuosa	17,39	0,82	-	3,21
Secreción vaginal sanguinolenta	4,35	0,75	-	2,16
Secreción vaginal maloliente	8,70	0,57	-	6,71
Fatiga	39,13	0,88	-	3,52
Pérdida de peso	26,09	0,97	-	0,65
Anemia	43,48	0,84	-	5,76
Dispareunia	13,04	1,36*	-	3,79
Hematuria	4,35	0,28	-	11,59
Incontinencia urinaria	17,39	0,75	-	4,74
Sangrado rectal	-	-	-	10,05
Dolor mi	21,74	1,26*	-	3,88

Leyenda. Penfexp: prevalencia de enfermos expuestos; RP: razón de prevalencia; χ^2 : Chi de Mantel y Haenszel. *Asociación estadística

Como se observa en la Tabla 2, se han obtenido las prevalencias de expuestos, la razón de prevalencias que en caso de ser mayor a 1 demuestra asociación (factor de riesgo/factor de protección) entre las variables y el Chi cuadrado de Mantel-Haenszel, cuyo valor calculado mayor a -1.96 a +1.96, determinará que existe asociación estadísticamente significativa entre la variable (clínica/histopatología) y la exposición (virus).

3. Análisis y Discusión de Resultados

La prevalencia de HPV en América Latina y el Caribe es dos veces más alta que alrededor del mundo. En este trabajo la prevalencia fue 30,67%, más baja que lo encontrado en trabajos similares en Colombia (44,3%) y Perú (43,1%) (Camargo et al., 2014; Grinsztejn et al., 2009; Iwasaki, Galvez-Philpott, Arias-Stella Jr., & Arias-Stella, 2014).

Sin embargo, en otros estudios se observó que la frecuencia de infección por este virus, varía según el diagnóstico cito-histopatológico que se utilice. En este proyecto se utilizó PCR en tiempo real para la detección, incrementando la sensibilidad y especificidad.

En el presente trabajo se observó que 26,32% de las muestras con diagnóstico de NIC I eran HPV positivas, en clasificación Bethesda LSIL, frecuencia bastante más baja que las observadas en países como Venezuela con 68%, Chile 62%, Colombia 46,9% y

estudios previos en Ecuador.

Además en NIC II y NIC III, HSIL en Bethesda, se observó que la infección estuvo en 33,33%, mientras que en Chile estuvo en 55,9%, 53,8% Colombia y en estudios previos en Ecuador 50% (Bruni L et al., 2013; Correnti et al., 2011; Murillo, Molano, Martínez, Mejía, & Gamboa, 2009; Sánchez-Lander et al., 2012).

En cuanto a la presentación histopatológica más frecuente, se encontró que mientras más displásica es la histopatología del cérvix, más frecuente es la presentación del virus. Situación que se explica a través de los estudios previos de este virus y su relación con el cáncer de cérvix (Almonte et al., 2008; Bava, Thulasidasan, Sreekanth, & Anto, 2016; Bjurberg, Beskow, Kannisto, & Lindahl, 2015; Sánchez-Lander et al., 2012).

Este trabajo demostró una asociación entre la exposición a la infección y la presencia de secreción vaginal blanquecina y dispareunia. Estos hallazgos son similares a descripciones previas acerca de las presentaciones clínicas de la infección por el virus, en las que se coloca que las manifestaciones clínicas atípicas más frecuentes, además de la presentación subclínica son: prurito, ardor, dispareunia, secreción, fisuras, resequeidad vaginal y disuria (Boden, Eriksson, Rylander, & von Schoultz, 1988; Boden, Rylander, Evander, Wadell, & von Schoultz, 1989; Strand & Rylander, 1998; Wikstrom, 1995).

III. CONCLUSIONES

La detección del HPV y sus características tanto clínicas como histopatológicas, en la población, es de vital importancia para generar planes de prevención, control, así como para reconocer la utilidad de las intervenciones gubernamentales. Además es necesario desarrollar técnicas de detección de menor costo que sean de fácil sistematización y aplicación. Existen estudios desarrollados en el país que se enfocan únicamente en el segundo aspecto (Bruni L et al., 2013).

IV. REFERENCIAS

- Almonte, M., Albero, G., Molano, M., Carcamo, C., García, P. J., & Perez, G. (2008). Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.008>
- Bava, S. V., Thulasidasan, A. K. T., Sreekanth, C. N., & Anto, R. J. (2016). Cervical cancer: A comprehensive approach towards extermination. *Annals of Medicine*, 48(3), 149-161. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1145796>
- Bjurberg, M., Beskow, C., Kannisto, P., & Lindahl, G. (2015). [Cervical cancer is a clinical challenge]. *Lakartidningen*, 112.
- Boden, E., Eriksson, A., Rylander, E., & von Schoultz, B. (1988). Clinical characteristics of papillomavirus-vulvovaginitis. A new entity with oncogenic potential. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 67(2), 147-151.
- Boden, E., Rylander, E., Evander, M., Wadell, G., & von Schoultz, B. (1989). Papilloma virus infection of the vulva. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 68(2), 179-184.
- Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Serrano B, Brotons M, Cosano R, Muñoz J, ... Castellsagué X. (2013). Human Papillomavirus and Related Diseases in Ecuador. Summary Report . ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre).
- Camargo, M., Soto-De Leon, S. C., Munoz, M., Sanchez, R., Peña-Herrera, D., Pineda-Peña, A. C., ... Patarroyo, M. A. (2014). Human papillomavirus detection in women with and without human immunodeficiency virus infection in Colombia. *BMC Cancer*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-451>
- Correnti, M., Medina, F., Cavazza, M. E., Rennola, A., Ávila, M., & Fernández, A. (2011). Human papillomavirus (HPV) type distribution in cervical carcinoma, low-grade, and high-grade squamous intraepithelial lesions in Venezuelan women. *Gynecologic Oncology*, 121(3), 527-531. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.02.003>
- De Sanjosé, S., Serrano, B., Castellsagué, X., Brotons, M., Muñoz, J., Bruni, L., & Bosch, F. X. (2012). Human papillomavirus (HPV) and related cancers in the Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) countries. A WHO/ICO HPV Information Centre Report. *Vaccine*, 30(Suppl 4), D1-83.
- Goldie, S. J., Gaffikin, L., Goldhaber-Fiebert, J. D., Gordillo-Tobar, A., Levin, C., Mahe, C., & Wright, T. C. (2005). Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *The New England Journal of Medicine*, 353(20), 2158-2168. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa044278>
- Goodman, A. (2015). HPV testing as a screen for cervical cancer. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 350, h2372.
- Grinsztejn, B., Veloso, V. G., Levi, J. E., Velasque, L., Luz, P. M., Friedman, R. K., ... Palefsky, J. (2009). Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.031>
- Horton, S., & Gauvreau, C. L. (2015). Cancer in Low- and Middle-Income Countries: An Economic Overview. En H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan, & S. Horton (Eds.), *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- Hutter, J. N., & Decker, C. F. (2016). Human papillomavirus infection. *Disease-a-Month*: DM, 62(8), 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2016.03.014>
- Iwasaki, R., Galvez-Philpott, F., Arias-Stella Jr., J., & Arias-Stella, J. (2014). Prevalence of high-risk human papillomavirus by cobas 4800 HPV test in urban Peru. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18, 469-472.
- Lee, S. H., Vigliotti, J. S., Vigliotti, V. S., & Jones,

- W. (2014). From Human Papillomavirus (HPV) Detection to Cervical Cancer Prevention in Clinical Practice. *Cancers*, 6(4), 2072-2099. <https://doi.org/10.3390/cancers6042072>
- Murillo, R., Molano, M., Martínez, G., Mejía, J.-C., & Gamboa, O. (2009). HPV Prevalence in Colombian Women with Cervical Cancer: Implications for Vaccination in a Developing Country. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2009, 9. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1155/2009/653598>
- Richart, R. M. (1969). A theory of cervical carcinogenesis. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 24(7 Pt 2), 874-879.
- Richart, R. M. (1973). Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathology Annual*, 8, 301-328.
- Sánchez-Lander, J., Cortiñas, P., Loureiro, C. L., Pujol, F. H., Medina, F., Capote-Negrín, L., ... Acosta, H. (2012). Human papillomavirus in invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 in Venezuela: A cross-sectional study. *Cancer Epidemiology*, 36(5), e284-e287. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.04.005>
- Soost, H. J., Lange, H. J., Lehmacher, W., & Ruffing-Kullmann, B. (1991). The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Cytologica*, 35(1), 8-14.
- Spencer Eugenio, A. L. F., & Ferrés Marcela. (2011). *Virología clínica*. Santiago de Chile: Mediterráneo Ltda.
- Strand, A., & Rylander, E. (1998). Human papillomavirus. Subclinical and atypical manifestations. *Dermatologic Clinics*, 16(4), 817-822.
- Wikstrom, A. (1995). Clinical and serological manifestations of genital human papillomavirus infection. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum*, 193, 1-85.