

“Evaluación de Anticuerpos anti-HPV16 y anti-HPV18 en mucosa vaginal frente a la vacunación contra el Papiloma Virus Humano en mujeres entre los 18 y 55 años en Antioquia”

Claudia Elena Espinal Correa
Claudia Marcela Álvarez Florez
Héctor Manuel Quirós Arango
Jaime Alonso Restrepo Carmona
Arlex Uriel Palacios Barahona
Héctor Mario Restrepo Montoya
Douglas Lizcano Cardona
Isabel Cristina Suárez Osorio
Faber López Zapata

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS, ADMINISTRATIVAS Y AFINES
ESPECIALIZACIÓN EN GERENCIA DE LA CALIDAD Y AUDITORIA EN SALUD
MEDELLÍN
2011

	FICHA TÉCNICA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	Actualización		
		Día	Mes	Año
		10	08	2011

INFORMACIÓN GENERAL

TÍTULO DEL PROYECTO	
Evaluación de Anticuerpos anti-VPH16 y anti-VPH18 en mucosa vaginal frente a la vacunación contra el Virus del Papiloma Humano en mujeres entre los 18 y 55 años en Antioquia	
DATOS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL	
NOMBRE DEL INVESTIGADOR	Héctor Manuel Quirós Arango
TELÉFONO	3104267000
DIRECCIÓN ELECTRÓNICA	hectorquirosa@antioquia.gov.co
NOMBRE DEL INVESTIGADOR	Claudia Elena Espinal Correa
TELÉFONO	3113113122
DIRECCIÓN ELECTRÓNICA	claudia.espinal@ucc.edu.co
NOMBRE DEL INVESTIGADOR	Claudia Marcela Álvarez Flórez
TELÉFONO	3004948220
DIRECCIÓN ELECTRÓNICA	claudiam.alvarez@ucc.edu.co
DATOS DEL GRUPO	
Investigación en Salud Internacional Especialización Gerencia de la Calidad y Auditoría en Salud Facultad de Ciencias Económicas, Administrativas y Afines Universidad Cooperativa de Colombia	
COINVESTIGADORES	
NOMBRE	FUNCIÓN EN EL PROYECTO
Jaime Alonso Restrepo Carmona	Médico Especialista en Gerencia de la Calidad y Auditoría en Salud Recolección y análisis de información
Arlex Uriel Palacios Barahona	Médico Especialista en Auditoría en salud – Recolección y análisis de información
Héctor Mario Gabino Restrepo Montoya	Médico Especialista en Administración Recolección y análisis

	de información	
ESTUDIANTES		
Isabel Cristina Suárez Osorio	Estudiante Especialización Gerencia de la Calidad y Auditoría en Salud. Recolección de la información.	
Faber López Zapata	Estudiante Especialización Gerencia de la Calidad y Auditoría en Salud. Recolección de la información.	
DURACIÓN DEL PROYECTO (en meses)	5 meses	
DATOS DEL PRESUPUESTO		
	NOMBRE	VALOR
VALOR TOTAL DEL PROYECTO		\$ 194.840.000
VALOR SOLICITADO A COLCIENCIAS		\$0
VALOR APROBADO POR OTRA(S) ENTIDAD(ES)	Secretaría Seccional de Salud y Protección Social de Antioquia	\$ 194.840.000
VALOR SOLICITADO AL CONADI		\$0

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDADES Y PERTINENCIA (MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE)

Dentro de las enfermedades consideradas como problemas de salud pública a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud, se encuentra el cáncer cervicouterino (CCU) con una de las cifras más altas de incidencia (1). Anualmente, se diagnostican medio millón de casos y mueren 274.000 mujeres por esta causa a nivel mundial (1). Particularmente, Colombia se ubica dentro de los países con las cifras más altas al ser comparado con otros países de la región (2) y según estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, el CCU se ubica en el primer lugar en incidencia y causa de muerte en las mujeres (3). Al estimar la incidencia del cáncer de cuello del útero por departamentos durante los años 2002-2006, el Instituto Nacional de Salud reportó que los departamentos con mayor número de casos nuevos corresponden en su orden a Bogotá, Antioquia y Valle del Cauca (3).

La infección por algunos tipos del VPH se reconoce como la causa principal y necesaria para generar enfermedades pre-invasivas e invasivas del aparato genital (4,5). En un estudio realizado en dos ciudades colombianas, se encontró que en 82,3% mujeres con carcinoma celular escamoso (CCE) se encontró VPH y que los

genotipos más frecuentes en estas biopsias fueron en su orden 16, 18, 45, 3, 58, 33, 56, 59, 52, 35 y 44; mientras que para mujeres con adenocarcinoma, la prevalencia de VPH fue de 94.6% y los genotipos más frecuentes fueron 16, 18, 31 y 56 (6).

Hoy en día se reconoce que el uso de la prueba de Papanicolau como medida de prevención, ha sido responsable de una disminución del 70% de los casos de cáncer cervical en naciones industrializadas en los últimos 50 años (7,8), sin embargo esta experiencia está lejos de ser reproducida en países en vía de desarrollo como el nuestro, ya que el número de mujeres que se realiza esta prueba es limitado y la prueba está sujeta a múltiples errores que disminuyen su utilidad diagnóstica. Por otro lado, la introducción de vacunas contra el VPH en países desarrollados también ha tenido un impacto en la disminución del CCU (9,10). Específicamente, se ha reportado que la vacuna Cervarix en población femenina de 10 a 14 años, fue considerablemente inmunogénica y de duración sostenida (11). A pesar de lo anterior, cuando la vacuna fue aplicada en mujeres mayores de 40 años la duración de la respuesta inmunológica no fue igual al de la población femenina joven, lo que sugiere que la producción de anticuerpos es dependiente de la edad observándose una disminución significativa en la respuesta inmune a medida que la edad avanza (11). Este último hallazgo, tiene un gran agravante y es que el 70% de los casos nuevos y el 80% de las muertes por cáncer cervical se presentan en mujeres mayores de 45 años (2).

Desde el año 2008, se vienen usando en Colombia las dos vacunas comercialmente ofrecidas, Cervarix® de GlaxoSmithKline Biologicals S.A. y Gardasil® de Merck & Co, Inc; las cuales inducen la producción de anticuerpos contra los genotipos 16 y 18. Además, Gardasil ofrece protección contra los genotipos 6 y 11 productores de condilomas acuminados. Las vacunas actuales contra el VPH han demostrado una eficacia muy prometedora en estudios recientemente finalizados y en pruebas clínicas en curso (9,10). De estas vacunas se ha sugerido que pueden inducir una respuesta inmunológica duradera y suficiente, que permite la neutralización y eliminación del virus cuando entra en contacto con el huésped. La literatura indica que la protección inmunológica en la mucosa vaginal es mediada principalmente por inmunoglobulina G (IgG), presente en este tejido gracias a varios mecanismos denominados transudación y exudación, con la producción conjunta de IgA en esta mucosa (12). Aunque las vacunas se convierten en una buena estrategia de protección, el estudio realizado sobre la respuesta inmunológica pos-vacunal contra VPH en Bogotá, Colombia sólo evaluó la presencia y cantidad de anticuerpos generados contra el virus en sangre (13) y no se midieron anticuerpos en la mucosa vaginal desconociendo que es en este tejido donde se presenta el contacto con el virus en la infección natural. Por esta razón, se hace necesario determinar el nivel de anticuerpos contra VPH en la mucosa vaginal de mujeres vacunadas, que puedan proteger a esta población frente a una posible exposición futura a este microorganismo. En consideración con lo expuesto anteriormente, los niveles de anticuerpos hallados en la secreción de endocérvix y su correlación con la edad, con el tiempo transcurrido después de la vacunación y otras variables, permitiría dar respuesta a los siguientes interrogantes:

¿Son suficientes los títulos de anticuerpos generados por la vacuna a nivel de la mucosa vaginal, para proteger frente a una futura exposición al VPH? Los cambios de la respuesta inmunológica debidos a la edad se constituyen en un factor que se tendrá que tener en cuenta para la aplicación y efectividad de la vacuna?

A pesar de los estudios realizados sobre la efectividad de la vacuna contra el VPH no existen reportes en la literatura científica que analicen la cantidad de IgG e IgA contra el VPH a nivel de la mucosa vaginal, su sostenibilidad en el tiempo y su relación con los cambios inmunológicos debidos a la edad en mujeres colombianas vacunadas. Es importante anotar que la potencia del sistema Inmune para producir anticuerpos puede disminuir en razón de la edad, como consecuencia propia de los sistemas biológicos y de la senescencia celular. Por lo tanto, llevar a cabo la presente propuesta, mediante la cuantificación de Acs protectores presentes en el endocérvix de mujeres vacunadas de diferentes edades con una prueba de ELISA, permitiría determinar la efectividad de la vacuna en la población antioqueña y establecer si dicha efectividad se disminuye en relación con la edad, lo que implicaría la necesidad de re-formular las dosis de vacunación en esta población susceptible, beneficiando a la población femenina expuesta, evitando aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad y disminuyendo los costos por atención primaria que deben asumir las Entidades Prestadoras de Servicios de Salud, debido a procesos infecciosos o al desarrollo de cáncer de cervical de sus usuarias.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los niveles de anticuerpos anti-VPH16 y anti-VPH18 en mucosa cervical de mujeres entre los 18 y 55 años sometidas al esquema completo de vacunación contra el VPH mediante la prueba de ELISA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Titular anticuerpos de tipo IgG e IgA contra VPH vacunal provenientes de muestras cervicovaginales obtenidas de mujeres vacunadas con edades entre los 18 y 55 años, mediante una prueba de ELISA directa.
2. Establecer diferencias entre los niveles de anticuerpos encontrados en mujeres con edades entre los 18-30 años, entre 31-39, entre 40-45 y entre 46-55 años.
3. Concluir mediante los datos estadísticos estimados, la sostenibilidad en el tiempo de la producción de IgG e IgA contra el VPH generados tras la aplicación del esquema completo de vacunación, en el grupo de mujeres mayores de 40 años estudiadas.

METODOLOGIA PROPUESTA

Tipo de estudio

Estudio descriptivo transversal

Población muestral

Todas las mujeres que posean el esquema completo de vacunación para VPH reportadas en las bases de datos de EPS y entidades privadas habilitadas por la Direccional Seccional de Salud para la aplicación de la vacuna.

Muestra poblacional

De la base de datos se seleccionará aleatoriamente un grupo de mujeres entre 18 y 55 años. Tamaño muestral: muestra suficiente.

Criterios de inclusión:

- Esquema de vacunación completo
- Tener entre 18 y 55 años

Criterios de exclusión:

- No poseer el esquema completo de vacunación para VPH
- Tener menos de 18 años y más de 55
- Tener alguna inmunodeficiencia
- Que haya transcurrido menos de un año después de la aplicación de la última dosis vacunal.

Recolección de la muestra de endocérnix

Cada participante deberá diligenciar un cuestionario (ver anexo) y firmar el consentimiento informado (ver anexo) previo a la toma de la muestra.

Toma de la muestra:

1. Suero: Se obtienen 5 ml de sangre periférica por medio de venopunción. Se rotula un tubo sin aditivos, tipo vacutainer (tapa oro), se hace asepsia en el sitio de elección para la sangría y se procede a la toma de muestra. Se centrifuga el tubo a 2500 rpm durante 10 minutos, con ayuda de una pipeta pasteur se separa el suero a un vial debidamente rotulado con el código del paciente.
2. Secreción cervical: Se debe rotular un criovial con el código asignado en la base de datos de la muestra. Antes de tomar la muestra, se debe pesar la

esponja oftálmica Merocel (XOMED Surgical Products) y registrar el valor obtenido.

En posición ginecológica, se introduce el espéculo y luego de localizar el cuello del útero, con ayuda de una pinza Forester se debe poner la esponja en su abertura por 30 segundos, ésta se retira y se deposita en un criovial estéril de 2 mL para ser conservada temporalmente en hielo seco y luego pasarlo a -70°C . Este procedimiento se hará dos veces por paciente, rotulando los viales cómo #1 y #2 de acuerdo al momento de la toma de la muestra.

Procesamiento de la muestra

Cada esponja que contiene la muestra congelada de secreción cervical, debe ser pesada para estimar el volumen de muestra absorbida por la esponja. Luego se adiciona lentamente a la esponja 300 μL del buffer de extracción (PBS, 256 mM NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina). Después de 30 minutos a 4°C , las esponjas son centrifugadas a 13.000 x grav por 15 minutos a 4°C en una microcentrífuga para separar la muestra recolectada de la esponja. Inmediatamente, se retira la esponja, se deposita en un vial distinto, se adicionan 300 μL del buffer de extracción y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. Los sobrenadantes obtenidos en ambas extracciones son combinados. De esta mezcla se retiran 5 μL para la detección de hemoglobina. Posteriormente, se adicionan 4 μL de suero fetal bovino al resto de la muestra. La muestra se alícuota para la cuantificación de anticuerpos o se congela a -70°C para su análisis posterior (14).

Cuantificación de anticuerpos anti-PVH16 y anti-PVH18 por ELISA

Las muestras de secreción cervical se deben descongelar a temperatura ambiente y luego son diluidas comenzando con una dilución 1/10 y luego de manera seriada se hacen siete diluciones dobles en la solución de bloqueo (PBS 4% de leche descremada y 0.05% Tween 20).

Los microplatos de 96 pozos (Maxisorp, Nunc) son cubiertos con los péptidos VLP L1 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de HPV16 (270ng/100 μL) y HPV18 (270ng/100 μL) diluidos en buffer bicarbonato/ carbonato de sodio (0.1M de carbonato de sodio, 0.1 M bicarbonato de sodio pH 9.6) a 4°C por toda la noche. Posteriormente, los platos son lavados cuatro veces con TBS que contiene 0.1% Tween 20 (TBS/Tween 20). Los sitios de unión inespecífica son bloqueados con 200 μL de PBS que contiene 5% de leche en polvo sin grasa y 0.05% Tween 20 (Tween 20 diluido en 0.9% de cloruro de sodio, solución NT) por 2 horas a 37°C . Después de lavar con solución NT, se adicionan las diluciones seriadas de las muestras, los standard y controles, diluidos en buffer por 2 horas a 37°C . Se realizan cuatro lavados con la solución NT y se adicionan 100 μL de anti-IgG humana o anti-IgA humana de cabra conjugados con peroxidasa diluidos 1:500 previamente en buffer de bloqueo, a cada pozo (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Los platos son incubados por 1 hora y media a 37°C . Después de lavar cuatro veces con el buffer NT, se agrega

tetrametilbenzidina (TMB) a cada plato y se adiciona ácido sulfúrico 0.36N para finalizar la reacción. Leer a 450/620nm. Los títulos de anticuerpos son calculados por mediciones de absorbancia hechas en referencia a la curva standard, realizada con anticuerpos IgA e IgG de cabra contra VPH, usando la siguiente ecuación de cuatro parámetros: $A + \frac{(B-A)}{1 + ((C/DO)^D)}$ donde DO: densidad óptica, A: asíntota mínima de la curva, B: asíntota máxima de la curva, C: el punto medio de la curva y D: la pendiente de la curva. Software: Soft Max Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). (14,15,16)

Se debe calcular el factor de dilución para la normalización de las muestras. La determinación del factor se realiza basándose en el peso seco de la esponja y el volumen de la muestra cómo se describe a continuación: $[(x-y) + 0.6 \text{ ml de buffer}]/(x-y)$, donde x corresponde al peso de la esponja después de la recolección; y es el peso de la medición de la esponja seca (Castle P. 2004).

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Tiempo en meses	1	2	3	4	5
	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
a. Ajuste al proyecto de investigación	x				
b. Ubicación población objeto	x	x			
c. Selección de la muestra y depuración de la base de datos		x			
d. Toma de muestras por citología y procesamiento			x		
e. Análisis de datos obtenidos				x	
f. Informe final Presentación y divulgación de resultados				x	x
g. Bibliografía	x	x	x	x	x

RESULTADOS ESPERADOS

Se hace necesario desarrollar estrategias para el control eficaz del virus, estas deben albergar:

Crear programas de vacunación masivos en la población con alto riesgo de contraer infección por VPH, principalmente mujeres con vida sexual activa; permanecer ajenos a esta imperante necesidad tendrá como consecuencias un aumento progresivo en el desarrollo de cáncer de cérvix, en las tasas de morbilidad y mortalidad, en los costos por atención hospitalaria en lo concerniente a la aplicación de terapias efectivas para garantizar sobrevivencia después de la infección.

Es importante implementar proyectos de investigación que conlleven a vigilar, predecir y cuantificar los niveles de Ac protectores desarrollados tras la aplicación de las vacunas existentes, no hacerlo puede desembocar en el desarrollo tardío de la infección por la carencia de Ac capaces de mantenerse a largo plazo en el cuerpo.

No establecer los títulos de IgG e IgA contra el VPH y la calidad de esto en relación a la respuesta inmune en mujeres mayores de 40 años vacunadas contra el VPH, comparadas con mujeres vacunadas entre los 18 y 55 años, y como respuesta a la primera dosis de vacunación, se puede constituir, sin lugar a dudas, en una de las principales causas del aumento en las tasas de morbilidad y mortalidad por infección o reinfección con el VPH y el desarrollo de cáncer cervical, lo que a su vez repercutirá en los costos de atención hospitalaria implicadas en el tratamiento de procesos oncológicos.

Si ya se ha demostrado en los estudios retrospectivos del VPH, que su nicho por excelencia son las células escamosas del tracto cérvico-uterino, es decir su desarrollo exitoso está en el tracto genital femenino; considerando además, que el 70% de los casos con desarrollo de cáncer cervical obedece al papiloma virus, se postula éste como la primera causa de mortalidad y morbilidad en mujeres, que tras adquirir la infección y no desarrollarse la inmunidad natural de manera eficaz, cuando se ha estado expuesta al virus, se desarrollan lesiones pre-cancerosas que rápidamente devienen en cáncer de cérvix; atendiendo además a otros factores no menos importantes, tales como:

- a- Que la población femenina en Colombia comienza su vida sexual cada vez más temprano.
- b- Que el promedio de mujeres cabeza de familia es de orden ascendente en el panorama social propio del país, donde el conflicto social deja desprotegidos a las familias ya sea por muerte violenta del padre, por abandono del hogar o los altos índices de separación de parejas, lo que conlleva a que las mujeres asuman en parte o totalmente la economía familiar, y que ante la muerte de estas madres cabeza de familia, sería inevitable la agudización de la problemática social del país.

- c- Que los costos de tratamiento por cáncer se triplican en los sistemas hospitalarios que deban atender a mujeres con desarrollo de cáncer cervical, versus aplicación masiva de dosis profilácticas de vacuna.
- d- Que los estudios existentes no aseguran protección prolongada en mujeres mayores de 40 años, tras la vacunación profiláctica.

Por todo lo anterior es apenas lógico que los principales beneficiarios en el desarrollo de esta investigación sea la población femenina mayor de cuarenta años, susceptible de no estar protegida tras la primera dosis de vacunación, pretendiendo que tras re-dosificar las dosis de vacuna como conclusión de este estudio, dicha población pueda contar con niveles de protección verificables y de alta calidad en el tiempo (más allá de los 18 meses promedio reportados en la literatura), disminuyendo el impacto social, económico y de salud que significa contraer el VPH en la población femenina en Colombia; ya que el estudio se llevaría a cabo a partir de mujeres del Valle de Aburrá, a través de la Secretaría Seccional de Salud de Antioquia, sus resultados se podrían generalizar y convertirse en marco de referencia para cualquier población femenina, en tanto el virus hasta ahora no ha mostrado prevalencia dependiente de razas, zona geográficas, estratos socioeconómicos, sino, características trópicas propias del clima celular en que se desarrolla con éxito.

COMPROMISOS Y ESTRATEGIAS DE COMUNICACIÓN

Publicación de un artículo en revista indexada y presentación en eventos de salud pública.

FUNCIONES DEL ESTUDIANTE

- Participar de acuerdo al desarrollo del proyecto en la recopilación de la información.
- Apoyar en la revisión bibliográfica de los temas relacionados con la misma en las bases de datos bibliográficas indexadas y en la literatura gris existente relacionada con el tema.
- Servir de apoyo en el proceso de análisis y discusión de resultados y en la forma de presentación final de la información.

PRESUPUESTO

RUBROS	TOTAL
Personal	70.000.000
Servicios Técnicos	3.500.000
Equipos y Software	23.000.000
Impresos y Publicaciones	3.000.000
Viajes	32.840.000
Materiales e Insumos	50.000.000
Comunicaciones y Transporte	10.000.000
Administración	2.500.000
TOTAL	194.840.000

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de la Salud. Planificación de programas apropiados para la prevención del cáncer cervicouterino. Programa para una tecnología apropiada en salud. En: http://ncd.bvsalud.org/lildbi/docsonline/1/3/031planificacion_de_programas_prevencon.pdf
2. Lewis, Merle J. A Situational Analysis of Cervical Cancer in Latin America and the Caribbean. Washington, DC: Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO), 2004.
3. Instituto Nacional de Cancerología. Anuario Estadístico 2009. 2009;7:32.
4. Syrjänen KJ, Pyrhönen S. Demonstration of human papilloma virus antigen in the condylomatous lesions of the uterine cervix by immunoperoxidase technique. Gynecol Obstet Invest. 1982;14(2):90-6.
5. Pilotti S, Rilke F, Alasio L, Fontanelli R. Histologic evidence for an association of cervical intraepithelial neoplasia with human papilloma virus infection. Diagn Gynecol Obstet. 1982;4(4):357-62.
6. Murillo R, Molano M, Martínez G, Mejía J, Gamboa O. HPV Prevalence in Colombian Women with Cervical Cancer: implications for vaccination in a Developing Country. Infect Dis Obstet Gynecol. 2009; 2009: 653598.
7. Bray F, Loos AH, McCarron P, et al. Trends in cervical squamous cell carcinoma incidence in 13 European countries: changing risk and the effects of screening. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005;14:677–86.

8. Hristova L, Hakama M. Effect of screening for cancer in the Nordic countries on deaths, cost and quality of life up to the year 2017. *Acta Oncol* 1997;36 Suppl 9:1–60.
9. Choi YH, Jit M, Gay N, Cox A, Garnett GP, Edmunds WJ. Transmission dynamic modelling of the impact of human papillomavirus vaccination in the United Kingdom. *Vaccine*. 2010;28(24):4091-102.
10. Gauthier A, Martín-Escudero V, Moore L, Ferko N, de Sanjosé S, Pérez-Escolano I, et al. Long-term clinical impact of introducing a human papillomavirus 16/18 AS04 adjuvant cervical cancer vaccine in Spain. *Eur J Public Health*. 2008;18(6):674-80.
11. Pedersen C, Petaja T, Strauss G, Rumke HC, Poder A, Richardus JH, et al. Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 L1 virus-like particle vaccine containing AS04 adjuvant. *J Adolesc Health*. 2007;40(6):564-71.
12. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):185-94.
13. Joura EA, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernández-Ávila M, et al. HPV antibody levels and clinical efficacy following administration of a prophylactic quadrivalent HPV vaccine. *Vaccine*. 2008;26(52):6844-51.
14. Kemp TJ, García-Piñeres A, Falk RT, Poncelet S, Dessy F, Giannini SL, et al. Evaluation of systemic and mucosal anti-HPV16 and anti-HPV18 antibody responses from vaccinated women. *Vaccine* 26 (2008) 3608–3616.
15. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364(9447):1757–65.
16. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Webappendix. En: <http://image.thelancet.com/extras/04art10103webappendix.pdf>
17. Castle PE, Rodriguez AC, Bowman FP, Herrero R, Schiffman M, Bratti MC, et al. Comparison of ophthalmic sponges for measurements of immune markers from cervical secretions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004 Mar;11(2):399-405.

18. Suzich ja, ghim s-j, palmer hillfj, white wi, tamura jk, bell ja, et al. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc natl acad sci usa* 1995, 92(25):11553-7.

19. Giannini sl, hanon e, moris p, van mechelen m, morel s, dessy f, et al. Enhanced humoral and memory cellular immunity using phv 16/18 L1 vlp vaccine formulated with the mlp/aluminium salt combination (aso4) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006; 24 (33-34):5937-

20. Pederssen c, petaja t, straussg, rumke hc, podera, richardus jh, et al. Immunization of early adolescent females with human papillomavirus type 16 and 18 virus-like particle vaccine containing aso4 adjuvant. *J adolescent health* 2007; 40(6):564-71.

21. Schwartz tf, dubin g, on behalf of the hpv vaccine study investigators for adults women. Human papillomavirus (hpv) 16/18 L1 aso4 virus like-particle (vlp) cervical cancer vaccine is immunogenic and well-tolerated 18 months after vaccination in women up to age years. American society of clinical oncology annual meeting, chicago, usa, jun 1-5, 2007.