

Rola cytologii i testu DNA HPV w erze szczepionki antywirusowej

Cytology and DNA HPV-testing in the era of HPV-vaccine

Spaczyński Marek, Malkowska-Walczak Blanka, Nowak-Markwitz Ewa

Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Czynnikiem odgrywającym podstawową rolę w karcinogenezie raka szyjki macicy jest przetrwałe zakażenie onkogenym typem wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV).

Prowadzenie profilaktyki pierwotnej opartej na masowych i powszechnych szczepieniach przeciwko HPV daje ogromną nadzieję w przyszłości na obniżenie wskaźników zachorowalności i umieralności z powodu tego nowotworu. Pamiętać jednak należy o kontynuacji programów przesiewowych, ponieważ obecnie dostępne szczepionki I i II generacji nie chronią przed wszystkimi typami HPV.

Dlatego badanie cytologiczne nadal pozostanie szczególnym narzędziem, które pozwoli na wczesne wykrywanie stanów przedrakowych i raka szyjki macicy. Zastosowanie w profilaktyce testu DNA HPV zmieni zakres populacji, którą obejmie skrining i częstość wykonywania badań cytologicznych.

Słowa kluczowe: **rak szyjki macicy / badanie cytologiczne / wirus brodawczaka ludzkiego HPV / test HPV / szczepionka przeciwko HPV /**

Abstract

Human papillomavirus (HPV) persistent infection is the main factor leading to the cervical cancer carcinogenesis. Wide-spread public vaccination against HPV as primary prevention is expected to reduce cervical cancer incidence and mortality rates. It is essential to bear in mind that screening for precancerous lesions cannot be discontinued because vaccination will not protect the patients against HPV types which have not been included in the first and second generation of vaccines.

Key words: **cytology / HPV-testing / papillomavirus vaccines – therapeutic use / papillomavirus infections – prevention and control / papillomavirus infections – diagnosis / uterine cervical neoplasms /**

Adres do korespondencji:

Marek Spaczyński
Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
e-mail: ptgms@gpsk.am.poznan.pl

Otrzymano: 10.07.2007

Zaakceptowano do druku: 10.08.2007

Wstęp

W Europie każdego roku stwierdza się około 60 tysięcy nowych zachorowań na raka szyjki macicy, a liczba kobiet zdiagnozowanych i leczonych z powodu zmian o charakterze CIN jest prawdopodobnie dwukrotnie większa [1].

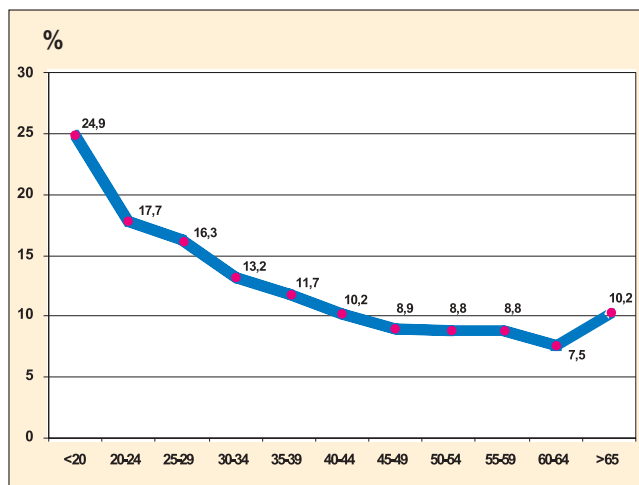
Kraje Europy Wschodniej reprezentują obszar o szczególnie wysokim ryzyku zachorowania na ten nowotwór. Według danych krajowego rejestru nowotworów z 2004 roku wynika, że w Polsce na raka szyjki macicy zachorowało 3345 kobiet a 1819 zmarło. Stawia to nasz kraj na jednym z pierwszych miejsc pod względem liczby zachorowań i zgonów [2].

Grupa ekspertów IARC (IARC – *International Agency For Research On Cancer*) potwierdziła, że trzynastcie onkogennych typów HPV wysokiego ryzyka jest odpowiedzialnych za powstawanie raka szyjki macicy (HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 oraz 66) [3].

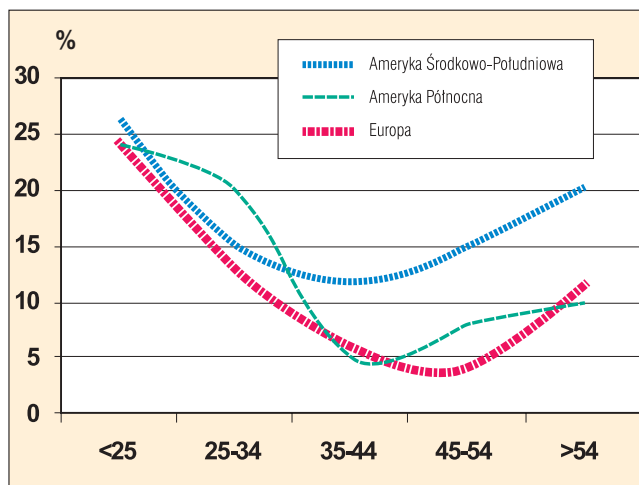
Najnowsze badania oparte na analizie przypadków klinicznych chorych z rakiem szyjki macicy wskazują, że pięć dodatkowych typów HPV (26, 53, 68, 73 oraz 82) również uczestniczy w procesie nowotworzenia [4]. Za rozwój ponad 70%, tj. około 42 900 zachorowań na raka szyjki macicy w Europie odpowiedzialne są dwa typy wirusa HPV, tj. 16 i 18. Zachorowania są związane z przetrwałą infekcją HPV, a za 70% z nich odpowiadają właśnie typy 16 i 18 wirusa [5]. Model rozwoju raka szyjki macicy wskazuje, że do zakażenia wirusem dochodzi bardzo często wkrótce po rozpoczęciu współżycia płciowego. Wyniki, przedstawione w Europie, jak i Ameryce Północnej oraz Południowej są bardzo podobne i wskazują, że częstość występowania HPV jest największa u dziewcząt i młodych kobiet. (Rycina 1 i 2).

W tym czasie wynik badania cytologicznego może być prawidłowy. Wykazano istotną współzależność pomiędzy wiekiem badanych i częstością występowania DNA HPV u kobiet z prawidłową cytologią. (Rycina 1).

U znacznej większości kobiet, bo aż u 80%, wirus ulega samoistnej eliminacji w ciągu 6 do 18 miesięcy. Wyleczenie następuje dzięki odpowiedzi komórkowej, a skutecznej odpowiedzi immunologicznej towarzyszy serokonwersja i obecność przeciwciał przeciwko białku kapsydowemu L1. Stężenia naturalnych przeciwciał są niskie, ponieważ immunogenne cząstki wirusów (białka kapsydu) są wydalane ze złuszczonego nabłonkiem i nie są wystarczająco prezentowane układowi immunologicznemu.



Rycina 1. Częstość występowania HPV DNA (%) wśród kobiet z prawidłową cytologią w zależności od wieku. [6]



Rycina 2. Częstość występowania HPV DNA wśród kobiet z prawidłową cytologią w zależności od wieku w Ameryce i Europie. [6]

Tabela I. Nowotwory związane z infekcją wirusem HPV w 2002 roku. [8]

Narząd	Związane z HPV (%)	KRAJE ROZWIŃIĘTE			KRAJE ROZWIJAJĄCE SIĘ		
		Nowotwory ogółem	Związane z HPV	% wszystkich nowotworów	Nowotwory ogółem	Związane z HPV	% wszystkich nowotworów
Szyjka macicy	100	83.400	83.400	1,7	409.400	409.400	7,0
Prącie	40	5.200	2.100	0,0	21.100	8.400	0,1
Srom, pochwa	40	18.300	7.300	0,1	21.700	8.700	0,1
Odbyt	90	14.500	13.100	0,3	15.900	14.300	0,2
Jama ustna	3	91.200	2.700	0,1	183.100	5.500	0,15
Krtań	12	24.400	2.900	0,1	27.700	3.300	0,1
Ogółem narządy		5.016.100	111.500	2,2	5.827.500	449.600	7,7

Rola cytologii i testu DNA HPV w erze szczepionki antywirusowej.

Odpowiedź immunologiczna w infekcji HPV jest zatem niska, ponieważ:

- Nie ma wirerii.
- HPV nie ma właściwości litycznych, czyli nie powoduje lizy keratynocytów, co ułatwiłoby uwolnienie antygenów z komórek.
- Nie powstaje odczyn zapalny i brak jest cytokin prozapalnych.
- Komórki Langerhansa i dendrytyczne nie są aktywowane.

U pozostałych zakażonych kobiet (około 20%) rozwija się przetrwała infekcja HPV, która u części z nich doprowadzi w ciągu 2-4 lat do powstania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN) [7].

Warto także wspomnieć, że HPV nie tylko wywołuje raka szyjki macicy, ale także raka prącia, sromu, pochwy, odbytu, jamy ustnej, krtani, co przedstawiono w tabeli I.

Szczepionki przeciw HPV są produkowane w oparciu o technologię inżynierii genetycznej. Antygenami są białka kapsydu wirusów VLP (*virus like particle*). Generują one wysokie miana przeciwciał, ponieważ:

1. Są podawane domięśniowo, a więc szybko dostają się do naczyń krwionośnych i lokalnych węzłów chłonnych.
2. Antygen jest szeroko prezentowany układowi immunologicznemu.
3. Wywołują dobrą odpowiedź limfocytów Th oraz limfocytów B.
4. Dominują przeciwciała neutralizujące i specyficzne dla typu wirusa (możliwa jest reakcja krzyżowa i krzyżowa neutralizacja dla bardzo podobnych typów wirusa).

Przeciwciała są obecne co najmniej 5 lat po dokonanej immunizacji.

Potencjalny wpływ szczepionki profilaktycznej HPV 16/18 na zapobieganie rozwojowi zmian CIN i raka szyjki macicy przedstawiono w tabeli II.

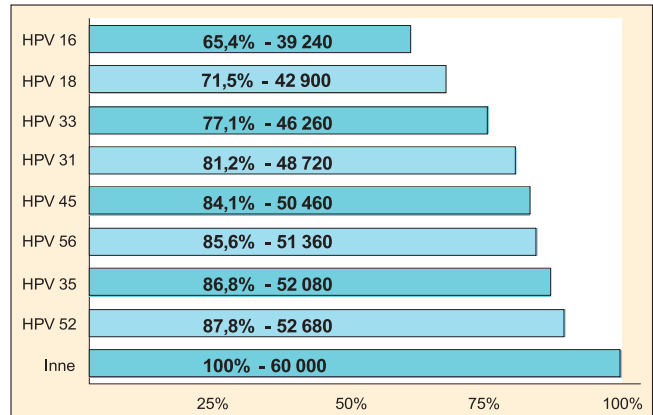
Tabela II. Potencjalny wpływ szczepionki HPV 16/18 na zmiany patologiczne szyjki macicy na świecie [9], [10], [11].

Typy HPV	Rak płaskonabłonkowy	Gruzołakorak	CIN 2/3 HSIL	CIN 1 LSIL
16/18	~ 70%	~ 89%	~ 53%	~ 25%
31/45	~ 6%	~ 6%	~ 7%	~ 11%
Całkowity 16/18/31/45	~ 76%	~ 95%	~ 60%	~ 36%

Skuteczność szczepionki:
Przetrwała infekcja HPV 16/18 = 100%
Ostra infekcja HPV 31 = ~54%; HPV 45 = ~94%

Dane szacunkowe wskazują, że gdyby 100% kobiet zostało zaszczepionych szczepionką chroniącą przed infekcją HPV 16, to rocznie zapobiegłoby to około 39 tysiącom (65,4%) nowych zachorowań na raka szyjki macicy w Europie.

Dodanie do tej szczepionki antygenów typu 18 HPV spowodowałoby, że rocznie około 71,5% czyli około 43 tysięcy kobiet w Europie nie zachorowałoby na raka szyjki macicy. Oktowalentna szczepionka chroniąca przed infekcją następującymi typami wirusa: 16, 18, 33, 31, 45, 56, 35, oraz 52 hipotetycznie zredukowałaby występowanie raka szyjki macicy



Rycina 3. Schemat kumulacyjnego występowania raka szyjki w Europie w odpowiedzi na zakażenie najczęstszymi typami HPV [5].

o 88% nowych przypadków rocznie, czyli 52 680 kobiet w Europie uniknęłyby tej choroby. (Rycina 3) [1].

Obecnie w większości krajów Europy Zachodniej na każde nowe zachorowanie na raka szyjki macicy wykryte w oparciu o badanie cytologiczne przypada w przybliżeniu około 50-100 nieprawidłowych wyników LSIL lub HSIL.

Dalsza diagnostyka i leczenie tych patologii chroni pacjentkę przed progresją do raka inwazyjnego. W programach przesiewowych prowadzonych w krajach Europy Zachodniej zmiany określane w badaniu cytologicznym jako ASCUS lub SIL (LSIL lub HSIL) stanowią około 10% [12].

Testy HPV przeprowadzone w przypadku nieprawidłowych wyników badania cytologicznego wykazują obecność onkogennych typów HPV w około 55-60% przypadków ASCUS oraz blisko 90% w rozpoznaniach LSIL [13].

Za około 20-30% zmian o charakterze ASCUS i LSIL odpowiedzialne są typy HPV 16 i 18 [14].

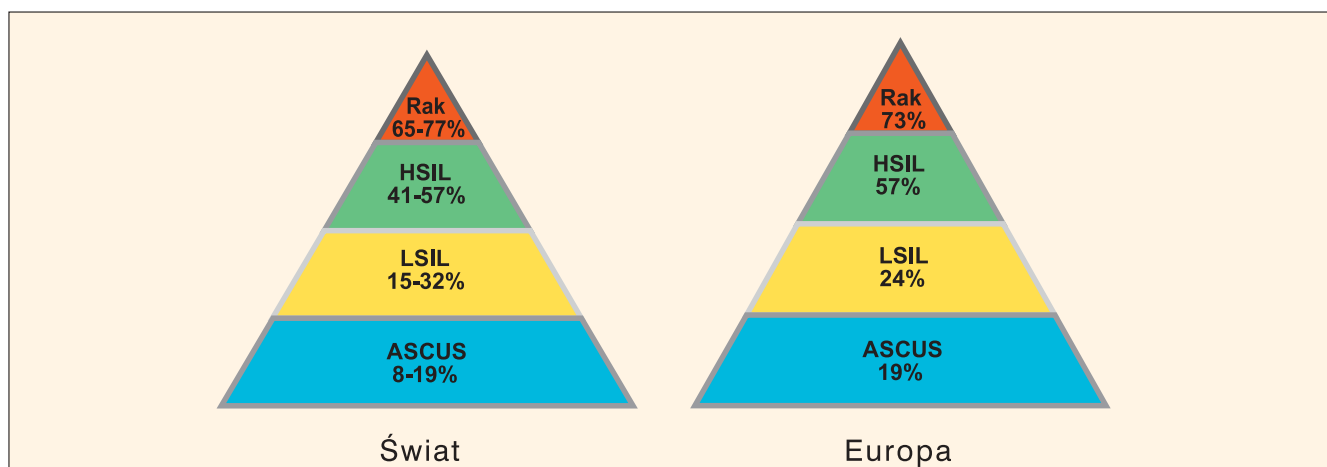
Dlatego w sytuacji, gdzie wynik badania na obecność HPV jest negatywny, ryzyko rozwoju choroby jest bardzo niskie. Z tego powodu uważa się, że wysoka negatywna wartość predykcijna (NPV) dla testu HPV ma ogromne praktyczne znaczenie dla programów przesiewowych.

Powstała teza, że wśród kobiet powyżej 30 roku życia, u których wynik testu DNA HPV jest negatywny, odstępy czasu pomiędzy badaniami profilaktycznymi mogą być dłuższe. Prawdopodobieństwo rozwoju CIN3 lub raka szyjki macicy jest u tych kobiet bardzo małe. (Lymette 2000).

Na rycinie 4 wykazano częstość występowania DNA HPV w zmianach patologicznych w komórkach szyjki macicy wykrywanych w badaniu cytologicznym. Zarówno dane opisujące to zjawisko na świecie, jak też dotyczące Europy są bardzo podobne i wskazują, że w zmianach typu ASCUS w 19% stwierdzono obecność HPV, podczas gdy w rakach szyjki występowanie wirusów brodawczaka ludzkiego wykazano w ponad 70%.

Na tej podstawie można stwierdzić, że u kobiet, które otrzymają pełne szczepienie w trzech dawkach, odsetek wyników cytologicznych z ASCUS i SIL będzie znacząco niższy. Obniży się (do około 60%) ilość badań kolposkopowych. Badanie cytologiczne charakteryzuje się mniej więcej stałą 51% czułością i 98% specyficznością.

Spaczyński M, et al.



Rycina 4. Częstość występowania HPV DNA w zmianach patologicznych szyjki macicy [15].

Szacuje się, że po wprowadzeniu obowiązkowych szczepień HPV dodatnia wartość predykcyjna dla nieprawidłowych wyników cytologicznych obniży się z obecnych 50-70% do 10-20%. Testy HPV dla wykrywania zmian o charakterze HSIL lub raka wykazują o 20-40% większą czułość, lecz o około 5-10% niższą specyficzność niż badanie cytologiczne. W sytuacji, gdy w odpowiedzi na szczepienia liczba zmian patologicznych szyjki macicy obniży się, wówczas dodatnia wartość testu HPV będzie proporcjonalnie wyższa w porównaniu do badania cytologicznego [16, 17].

Profilaktyczna szczepionka przeciwko HPV 16/18 może przyczynić się do redukcji minimalnych zmian śród nabłonkowych o około 25%, a po upływie 5-7 lat może wpłynąć na redukcję liczby CIN2/3/HSIL o około 50% i ACIS o około 50-60%. Może także za 15-20 lat obniżyć występowanie płaskonabłonkowego raka szyjki macicy o 76%, a raka gruczołowego o 96% [18].

Dostępne obecnie szczepionki nie chronią przed wszystkimi onkogennymi typami HPV. Sądzi się jednak, że wprowadzenie obowiązkowych i powszechnych szczepień przeciwko HPV do programu szczepień dla nastolatków zaowocuje w przyszłości znacznym spadkiem zachorowań na raka szyjki macicy i wymusi przebudowę struktury programów profilaktycznych. Uważa się, że tendencję spadkową zachorowalności na raka szyjki macicy zaobserwuje się dopiero po około 15 do 20, a nawet po 30 latach od wprowadzenia masowych szczepień [1].

Konwencjonalne, przesiewowe badanie cytologiczne przeprowadzane, co 5 lat u kobiet począwszy od 30 roku życia redukuje ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy w ciągu życia o 67%. Dodając do badań cytologicznych rutynowe, populacyjne szczepienia przeciwko typom 16 i 18 wirusa obejmujące przynajmniej 80% populacji, szacuje się, że redukcja zachorowań na raka szyjki macicy wyniosłaby około 89% [19].

Należy podkreślić, że szczepionki profilaktyczne nie wpływają na przebieg istniejącej infekcji HPV.

Wstępna analiza wielośrodkowego badania III fazy dotycząca stosowania czterowalentnej szczepionki wykazała brak protekcji przeciwko CIN2 i CIN3 lub AIS związanym z 16 i 18 typem HPV wśród kobiet, które były HPV-DNA dodatnie i sero-pozytywne dla 16 i 18 typu wirusa.

Ponadto ochrona ta była znacznie zredukowana u kobiet, które w momencie szczepienia były HPV dodatnie i sero-negatywne [20].

Powyższe dane sugerują potencjalną korzyść z badania w kierunku nosicielstwa HPV przed zaszczepieniem kobiet po inicjacji seksualnej lub, gdy zamierzamy zaszczepić kobiety starsze [1]. (Tabela III).

Tabela III. Proponowane zasady postępowania u kobiet po 26 roku życia [21].

• W badaniach klinicznych niezakażone kobiety >26 r.ż. także odniosą korzyści ze szczepień.
• 96% aktywnych płciowo kobiet >26 r.ż. jest HPV 16/18 DNA (-) i one odniosą korzyści ze szczepień.
• 4% aktywnych płciowo kobiet >26 r.ż. jest HPV 16/18 DNA (+),
• 25% HPV 16/18 DNA (+) / seronegatywnych kobiet odniesie korzyści ze szczepień.
– Tylko kobiety HPV 16/18 DNA (+) seropoztywne nie odniosą korzyści ze szczepień.
• Szczepionki HPV nie ułatwiają infekcji HPV i nie są szkodliwe dla kobiet HPV 16/18 (+).

Szczepionka nie chroni przed wszystkimi typami HPV, czyli nie chroni wszystkich zaszczepionych kobiet przed zachorowaniem na raka szyjki macicy. W chwili obecnej wiemy już, że szczepionki indukują odporność krzyżową również przeciwko innym typom HPV, ale trudno jest jednoznacznie określić, w jaki sposób zmieni to obserwowaną w populacji zachorowalność na ten nowotwór. Poszczepienny czas protekcji wynosi co najmniej 5 lat a oczekujemy, że będzie trwał powyżej 10 lat.

Obecnie trudno jest określić, kiedy u danej kobiety dojdzie do utraty zdolności ochronnych uzyskanych dzięki szczepieniu. Wprowadzenie masowych szczepień w ciągu kilku do dwudziestu, trzydziestu lat doprowadzi do znacznego zmniejszenia występowania przednowotworowych zmian szyjkowych, czego naturalnym następstwem będzie obniżenie wartości czynnika pozytywnej predykcji dla badań cytologicznych. Badania cytologiczne muszą być jednak nadal kontynuowane.

Rola cytologii i testu DNA HPV w erze szczepionki antywirusowej.

Bezwzględnie należy także zapobiec sytuacji, w której zaszczepimy kobiety regularnie uczęszczające na badania profilaktyczne natomiast nie zrobimy nic, aby zaszczepić kobiety, które tych badań unikają [22].

Dopóki szczepionki będą miały na celu chronić kobiety niezakażone a szczepienia będą nieobowiązkowe dopóty słuszna jest kontynuacja programu badań profilaktycznych w kierunku raka szyjki macicy w niezmiennym kształcie.

Podsumowanie

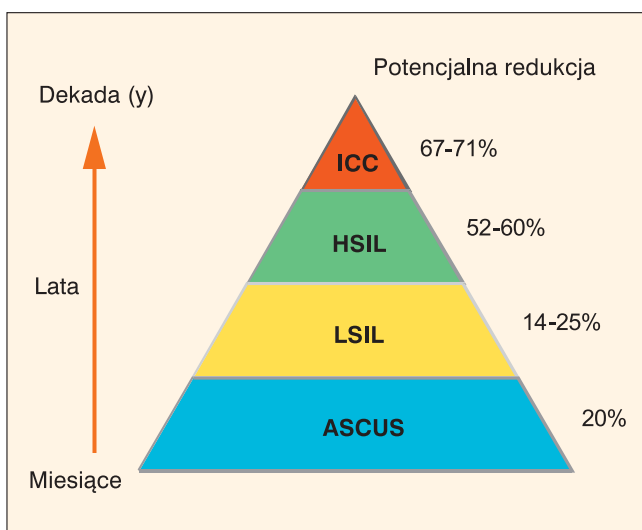
W przyszłości masowe i powszechne wdrożenie szczepionki u nastolatek będzie odgrywało główną rolę w strategii profilaktyki i walki z rakiem szyjki macicy. Nie zwolni to od stałego prowadzenia skriningu cytologicznego u wszystkich kobiet, niezależnie od tego czy zostały zaszczepione.

Szacuje się, że gdy większość kobiet będzie zaszczepiona przed inicjacją płciową i przed uzyskaniem dojrzałości płciowej, działania profilaktyczne będą wymagały wprowadzenia znaczących zmian metodologicznych, a częste badania cytologiczne okażą się nieefektywne ekonomicznie i zbyt kosztowne dla budżetu wielu krajów.

Wydaje się, że w erze szczepionki przeciwko HPV pierwotnym testem przesiewowym będzie test molekularny na DNA HPV, a badanie cytologiczne zostanie zarezerwowane dla przypadków z pozytywnym wynikiem testu HPV. Uważa się, że wprowadzenie testu HPV jako pierwszego testu przesiewowego umożliwi stworzenie rejestru osób zakażonych, obciążonych podwyższonym ryzykiem rozwoju CIN. Rejestr umożliwi długoletnie monitorowanie wyników cytologii u kobiet HPV dodatnich [16].

Jak już wspomniano, (Rycina 5), redukcja częstości zachorowań na CIN i raka szyjki macicy wpłynie na konieczność wprowadzenia zmian do programów profilaktyki raka szyjki macicy. Prawdopodobnie:

- dojdzie do wydłużenia przedziałów czasowych pomiędzy kolejnymi badaniami cytologicznymi,
- testy HPV znajdą zastosowanie w badaniach przesiewowych, jako badanie wykonane w pierwszej kolejności,



Rycina 4. Szacunkowy wpływ szczepionki 16 i 18 HPV na zmiany patologiczne szyjki macicy [24].

- badanie cytologiczne będzie wykonywane u kobiet z dodatnimi wynikami DNA HPV.
- Ulegną zmianie wytyczne programów profilaktyki raka szyjki macicy [23].

Piśmiennictwo

1. Arbyn M, Dillner J. Review of current knowledge on HPV vaccination: an appendix to the European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. *J Clin Virol.* 2007, 38, 189-197.
2. Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. *Krajowy Rejestr Nowotworów.* 2007.08.20. <http://epid.coi.waw.pl/krrn/>.
3. IARC Monograph Working Group, [et al.]. Human Papillomaviruses. Lyon, 15-22 February 2005. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs, Volume 90. Lyon: IARC, 2005
4. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez A, [et al.]. Chapter1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006, 24, 1-10.
5. Munoz N, Bosh F, Castellsague X, [et al.]. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004, 111, 278-285.
6. Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, [et al.]. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007, 7, 453-459.
7. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W. Skrining raka szyjki macicy w kraju i na świecie. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 354-360.
8. Parkin D. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006, 118, 3030-3044.
9. Clifford G, Smith J, Aguado T, [et al.]. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003, 89, 101-105.
10. Clifford G, Smith J, Plummer M, [et al.]. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003, 88, 63-73.
11. Harper D, Franco E, Wheeler C, [et al.]. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006, 367, 1247-1255.
12. Benard V, Ehemam C, Lawson H, [et al.]. Cervical screening in the national breast and cervical cancer early detection program, 1995-2001. *Obstet Gynecol.* 2004, 103, 564-571.
13. Castle P, Solomon D, Schiffman M, [et al.]. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005, 97, 1066-1071.
14. Clifford G, Rana R, Franceschi S, [et al.]. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14, 1157-1164.
15. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, [et al.]. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006, 24, suppl 3, S251-S261.
16. Franco E, Cuzick J, Hildesheim A, [et al.]. Chapter 20: Issues in planning cervical cancer screening in the era of HPV vaccination. *Vaccine.* 2006, 24, suppl 3, S171-S177.
17. Prinsen C, Fles R, Wijnen-Dubbers C, [et al.]. Baseline human papillomavirus status of women with abnormal smears in cervical screening: a 5-year follow-up study in the Netherlands. *BJOG.* 2007, 114, 951-957.
18. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Basta A. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące szczepienia przeciwko zakażeniom HPV. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 185-190.
19. Goldie S, Kohli M, Grima D, [et al.]. Projected clinical benefits and cost-effectiveness of a human papillomavirus 16/18 vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2004, 96, 604-615.
20. FDA Registrar Corp. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee (VRB-PAC). *GARDASIL.* Human papillomavirus [types 6,11,16 and 18] recombinant vaccine. 2007.08.20. www.fda.gov.
21. Department of Health and Human Services. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Resolution No 6/06-2.* 2007.08.20. <http://www.cdc.gov/>.
22. Franco E, Bosch F, Cuzick J, [et al.]. Chapter 29: Knowledge gaps and priorities for research on prevention of HPV infection and cervical cancer. *Vaccine.* 2006, 24, suppl 3, S242-S249.
23. Wright T, Bosh F, Franco E, [et al.]. HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine.* 2006, 24, suppl 3, S251-S261.
24. Bosch F. The Burden of HPV and HPV Diseases. The European perspective. *HPV Master Class Meeting,* 30-31 January 2007, Madrid, Spain.