

0 L.M. Puig-Tintoré
A. Torné
J. Ordi*
J. Galcerán**
J. Ferré***

Sección de Ginecología Oncológica y Prevención del Cáncer. Instituto Clínico de Ginecología, Obstetricia y Neonatología (IGCON). Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona.

*Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona.

**Departamento de Ingeniería de Sistemas, Automática e Informática Industrial. Universidad Politécnica de Cataluña.

***Arkofoto S.A. Barcelona.

Trabajo realizado, en parte, con ayudas de la Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia (AEPCC) y del Programa de Promoción de la Investigación en Salud del Fondo de Investigación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo de España (Beca FIS: 97/0729).

Correspondencia:

Dr. L.M. Puig-Tintoré.

Rosellón, 168, 2.º 2.ª. 08036 Barcelona.

Correo electrónico: Impuigt@medicina.ub.es.

Fecha de recepción: 7/9/01

Aceptado para su publicación: 26/10/01

Colposcopia digital en la neoplasia cervical intraepitelial. Correlación histológica y utilidad clínica

Digital colposcopy in cervical intraepithelial neoplasia. Histological correlation and clinical utility

L.M. Puig-Tintoré, A. Torné, J. Ordi, J. Galcerán, J. Ferré.
Colposcopia digital en la neoplasia cervical intraepitelial. Correlación histológica y utilidad clínica. Prog Obstet Ginecol 2001;44:490-496.

RESUMEN

Objetivo: Determinar, en la neoplasia cervical intraepitelial (CIN), la correlación histológica de la información morfométrica obtenida mediante un sistema original de colposcopia digital, y establecer sus posibles aplicaciones clínicas.

Métodos: En 101 pacientes con colposcopia valorable se midió el área de la zona de transformación y de las lesiones colposcópicas. En 62 casos, en los que se practicó exéresis de la lesión con asa, estos datos se correlacionaron con la extensión de las lesiones histológicas.

Resultados: A mayor grado histológico las lesiones cervicales incrementan significativamente su tamaño colposcópico (CIN-I, CIN-II, CIN-III: 90 mm², 134 mm², 265 mm², respectivamente) y ocupan una disposición más central en el cérvix. Existe una muy buena correlación, cercana al 85%, con el tamaño medido mediante morfometría histológica.

Conclusiones: El tamaño de la lesión colposcópica de la CIN es un buen indicador del verdadero tamaño lesional. Estos resultados abren una nueva perspectiva en la conducta a seguir en las lesiones de bajo grado, al ofrecer un método objetivo y fiable para controlar su evolución.

PALABRAS CLAVE

Colposcopia. Análisis de imagen. CIN. Morfometría. Historia natural.

SUMMARY

Objective: To determine the histological correlation of morphometric information obtained through an original digital colposcopy system in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and to establish its possible clinical applications.

Methods: The size of the transformation zone and of colposcopic lesions was measured in 101 patients with evaluable colposcopy. In the 62 patients who underwent loop excision of the lesion these data were correlated with histologic lesion size.

Results: The size of colposcopic lesions significantly increased with histologic grade (CIN-I, CIN-II, CIN-III: 90 mm², 134 mm² and 265 mm², respectively) and their location in the cervix was more central. A good correlation, nearly 85%, was found with size measured by histologic morphometry.

Conclusions: The size of colposcopic CIN lesions is a good indicator of true lesion size. These results provide a new perspective on the management of low-grade lesions by offering an objective and reliable method for controlling their evolution.

KEY WORDS

Colposcopy. Image processing. Cervical intraepithelial neoplasia. Morphometry. Natural history.

INTRODUCCIÓN

La colposcopia se ha consolidado como parte fundamental del protocolo para el diagnóstico de las lesiones intraepiteliales y el cáncer inicialmente invasivo del tracto genital inferior (TGI)¹. El estudio colposcópico permite la identificación de características sutiles de los epitelios, inapreciables a simple vista, que son la expresión de cambios patológicos. Sin embargo, tiene limitaciones, como la fugacidad de las imágenes observadas, la subjetividad de su interpretación y el hecho de que la cuantificación de ciertas características lesionales, como la valoración de su tamaño, sea muy inexacta.

Desde los inicios de la técnica en 1925 se puso de manifiesto la necesidad de disponer de algún sistema de documentación de las imágenes colposcópicas, tanto para su uso en la clínica como en la docencia y la investigación. Los simples esquemas en la historia clínica carecen de la objetividad necesaria

para precisar la naturaleza de los hallazgos colposcópicos anormales y su extensión topográfica. La colpofotografía no reúne condiciones para el estricto seguimiento de las lesiones cervicales en la clínica diaria. Los avances de la informática han posibilitado el desarrollo de la colposcopia digital (COD), que constituye una novedosa aportación a las técnicas de estudio de las lesiones intraepiteliales. La COD reúne una serie de características que la hacen muy adecuada para su aplicación en la clínica diaria: *a)* simplicidad de uso; *b)* visualización de las imágenes en tiempo real; *c)* procesamiento digital de las imágenes y cálculo morfométrico de las lesiones; *d)* documentación y recuperación inmediata de las imágenes archivadas; *e)* posibilidad de transmisión de las imágenes a distancia, y *f)* bajo coste. Los aspectos técnicos del sistema han sido publicados previamente^{2,3}.

La morfometría, planimetría o estereometría describen y cuantifican las características morfológicas de las lesiones. Tanto la histología como la colposcopia permiten obtener información morfométrica de las lesiones intraepiteliales del cuello uterino, como su extensión lesional o su topografía. El estudio del significado de esta información, obtenida mediante un sistema de COD y sus posibles aplicaciones clínicas, constituye el objetivo de este trabajo.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se han estudiado 101 pacientes con colposcopia valorable y diagnóstico histológico de CIN (CIN-I: 42, CIN-II: 29, CIN-III: 30). Las lesiones colposcópicas fueron medidas cuantitativamente mediante el módulo de morfometría de un sistema original de COD³. En síntesis, el sistema está formado por un colposcopio de luz fría con una óptica de 300 mm de distancia focal y cinco factores de aumento (0.4, 0.63, 1, 1.6 y 2.5), al que se conecta una videocámara Panasonic® CCD color de media pulgada. La señal se procesa en una tarjeta digitalizadora Matrox® instalada en un ordenador IBM-PC compatible, con procesador Pentium® 166 MMX, 32MB de memoria RAM y disco duro fijo de 8.5 GB. El monitor de 17 pulgadas, conjuntamente con la tarjeta gráfica SVGA, permite visualizar imágenes con resoluciones de hasta 1.024 × 768 píxeles y color verdadero (24 bits). El software del sistema integra una base de da-

2

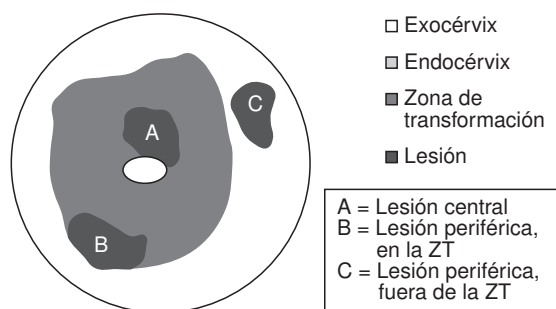


Figura 1. Modelo para el estudio morfométrico y topográfico.

tos clínicos, desarrollada por un grupo de trabajo de la AEPCC con la colaboración técnica de Arkofoto S.A.[®] (Barcelona, España), con otra de imágenes colposcópicas digitalizadas. Los módulos de captura de imágenes y de morfometría se han desarrollado por un equipo del Departamento de Ingeniería de Sistemas, Automática e Informática Industrial de la Universidad Politécnica de Cataluña y evaluados en la Sección de Ginecología Oncológica y Prevención del Cáncer del Hospital Clínic de la Universidad de Barcelona.

Para una correcta delimitación de las áreas patológicas, tras el estudio colposcópico con ácido acético al 3% se aplicó el test de Schiller utilizando una solución yodo-yodurada de Lugol (2 g de yodo metaloide, 4 g de yoduro potásico y 100 ml de agua destilada). En la figura 1 se expone el modelo usado para el análisis de las imágenes colposcópicas. El modelo asume que, en una colposcopia valorable, en el orificio cervical externo se visualiza la parte inferior del canal endocervical recubierto por epitelio cilíndrico que se extiende, en mayor o menor medida, por el exocervix (ectopia). En la periferia de la ectopia se localiza la zona de transformación (ZT), constituida por un epitelio metaplásico que se extiende desde la llamada nueva unión escamosocilíndrica hasta la que fue unión escamosocilíndrica original en donde se continúa, a menudo de forma insensible, con el epitelio escamoso original.

Los datos recogidos para análisis morfométrico son: a) el área de la ZT, que incluye toda el área limitada por la unión escamosocilíndrica original a la que hay que restar, en su caso, el área del orificio cervical externo o de la ectopia; b) el área lesional total (L) o suma del área de cada una de las lesiones,

y c) el porcentaje lesional, relación del área lesional total con el área de la zona de transformación (L/ZT). Los datos topográficos tienen en cuenta la localización de las lesiones en relación con el orificio cervical externo. Se diferencian en lesiones centrales, si contactan con el orificio cervical externo o se insinúan en el canal endocervical (fig. 1A) y lesiones periféricas, sin contacto con el orificio cervical externo, que a su vez pueden estar situadas, siguiendo la clasificación internacional (Roma 1990⁴), dentro de la ZT (fig. 1B) o por fuera de ella (fig. 1C).

En 62 pacientes (26 CIN-I, 18 CIN-II y 18 CIN-III) se realizó, además, una exéresis de toda la ZT mediante asa. La pieza de exéresis se procesó en el laboratorio mediante la técnica de cortes seriados de forma similar a la utilizada por Burghardt para el estudio morfométrico de piezas de conización⁵. El tamaño de la lesión histológica se estudió mediante un equipo de morfometría histológica digital, compuesto por un microscopio Olympus[®] BH2 conectado a una cámara Sony[®] y utilizando el software de análisis de imagen MIP de Microm[®] (Barcelona, España). El resultado de la medición histológica se comparó, en cada caso, con la extensión de las lesiones colposcópicas.

Para valorar estadísticamente las diferencias entre variables cuantitativas y comparar medias se ha utilizado la prueba de la t de Student. Para estudiar la relación entre dos variables cuantitativas se ha empleado el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r). Las diferencias entre datos apareados se han evaluado mediante el test de Wilcoxon.

RESULTADOS

En la tabla 1 se expresa la correlación entre las medidas de las lesiones colposcópicas, obtenidas mediante el módulo de morfometría, y el grado histológico de la CIN. La media del área lesional total y el porcentaje L/ZT aumentan a medida que aumenta el grado histológico: CIN-I, CIN-II, CIN-III: 90 mm², 134 mm², 265 mm² (p = 0,000004) y 34, 72 y 76% (p < 0,00001), respectivamente. Las lesiones de CIN-III son, aproximadamente, 3 veces más extensas que las lesiones de CIN-I.

En la tabla 2 se señala la correlación entre topografía y grado histológico de la CIN. Las lesiones de CIN-II y CIN-III se comportan topográficamente de for-

Tabla 1 Correlación entre morfometría y grado histológico de la CIN				
Grado CIN	Área lesional (mm ²)		Relación lesión/ZT (%)	
	Media	Rango	Media	Rango
CIN-I	90	6-370	34	4-100
CIN-II	134	8-487	72	14-100
CIN-III	265	8-800	76	22-100
p	0,000004		< 0,00001	

Tabla 2 Correlación entre topografía, grado histológico y morfometría			
Grado CIN (%)	Topografía lesional		
	Central	Periférica	
CIN-I	16,6	83,3	
CIN-II	62,0	37,9	
CIN-III	63,3	36,6	
p		< 0,001	
Morfometría			
Área lesional (mm ²)	218,5	117,4	
p		< 0,01	
Relación lesión/ZT (%)	81,1	39,4	
p		< 0,001	

ma semejante y se encuentran con mayor frecuencia en una localización más central que las lesiones de CIN-I. Por ello, no es de extrañar que las lesiones centrales sean de un tamaño y un porcentaje L/ZT significativamente mayor que las lesiones periféricas (218,5 frente a 117,4 mm²; p = 0,01 y 81,1 frente a 39,4%; p = 0,001). Las lesiones periféricas se corresponden, en general, a lesiones de CIN-I.

La concordancia entre el tamaño colposcópico e histológico de la CIN se indica en la tabla 3. El estudio mediante planimetría histológica digital de la pieza de exéresis con asa diatérmica evidenció, asimismo, un aumento progresivo del tamaño lesional medio en relación con el aumento del grado de la CIN, siendo las diferencias estadísticamente significativas (CIN-I: 67 mm², CIN-II: 89 mm², CIN-III: 127 mm², p = 0,009). A pesar de que el área lesional histológica es inferior en un 15% al área lesional media valorada colposcópicamente, en gran parte atribuible a la retracción que produce la fijación con formol, se observó una muy buena correlación, cercana al 85%, entre los tamaños lesionales medidos con colposcopia y los medidos en la pieza histológica

Tabla 3 Relación entre el tamaño lesional valorado mediante colposcopia e histología digitales					
Diagnóstico	n	Colposcópica		Lesión Histológica	
		Media (mm ²)	± DE	Media (mm ²)	± DE
CIN-I	26	60	54	67	61
CIN-II	18	113	85	89	60
CIN-III	18	171	128	127	75
Total*	62	108	90	91	68

*Pearson r_p = 0,846, p = 0,001; Wilcoxon p = 0,09.

(coeficiente de correlación de Pearson r_p = 0,846, p = 0,001). Además, las diferencias entre dichos tamaños, evaluadas mediante el test de Wilcoxon para datos apareados, no fueron estadísticamente significativas (p = 0,09).

DISCUSIÓN

Los primeros estudios morfométricos de la CIN fueron realizados en cortes histológicos por Burghardt⁵, quien describió con detalle la topografía y la extensión en superficie y en profundidad de la CIN en piezas de conización. Sus estudios demostraron que existe una estrecha correlación entre la extensión de la lesión, medida histológicamente, y el grado de la CIN. Las lesiones más extensas corresponden con mayor probabilidad a carcinoma *in situ* o microinvasivo que a displasias. Estos estudios, confirmados por otros autores⁶⁻⁹, permitieron afirmar que en su fase preinvasiva las neoplasias cervicales siguen un patrón de crecimiento de tipo gompertziano¹⁰.

La valoración del tamaño lesional mediante colposcopia convencional se realiza de forma subjetiva, clasificando cualitativamente las lesiones en pequeñas, medianas y grandes, o de forma semicuantitativa según el número de cuadrantes o el porcentaje de exocérnix afectado^{11,12}. La medición del área lesional mediante COD permite obtener una información cuantitativa exacta, así como caracterizar de forma objetiva la morfología y topografía de las lesiones intraepiteliales.

El innovador avance que representa la COD en relación con los datos morfométricos obtenidos de

Tabla 4 Diagnóstico de lesión escamosa de bajo grado por biopsia. Condiciones para su seguimiento, sin tratamiento

Edad menor de 40 años
Citología concordante
Ausencia de CIN previo
Ausencia de inmunosupresión
HPV-AR negativo
HPV-AR positivo en mujer < 30 años, repetir a los 6 meses
Colposcopia valorable
Lesión con cambios menores, totalmente visible
Posibilidad razonable de seguimiento
Sin ansiedad por parte de la paciente o del médico

las piezas operatorias es que permite obtener la información *in vivo*, previamente a cualquier biopsia o actuación terapéutica. Nuestros resultados evidencian que al aumentar el grado de la CIN las lesiones colposcópicas incrementan su tamaño y ocupan una disposición más central en el cérvix que las lesiones de bajo grado¹³. Además, demuestran que existe una muy buena correlación entre el tamaño de las lesiones escamosas intraepiteliales del cérvix medidas tanto con colposcopia como con histología digitales, es decir, la medición de la lesión colposcópica es fiel indicador del verdadero tamaño lesional. Estos resultados abren al clínico una nueva perspectiva en la conducta a seguir en la CIN, al ofrecer un método objetivo para controlar su evolución.

Diversos estudios han señalado las implicaciones clínicas que tiene el tamaño de la CIN, que se ha correlacionado con los falsos negativos de la citología¹⁴, la discordancia diagnóstica de la pequeña biopsia¹⁵, el fallo terapéutico^{16,17} y la progresión lesional^{18,19}. Además del tamaño lesional, otros factores conocidos de progresión de la CIN son: el grado histológico, la aneuploidía, el tipo de HPV y el estado inmunitario.

No hay acuerdo sobre cuál es la mejor conducta en las pacientes con diagnóstico histológico de lesión escamosa de bajo grado (L-SIL). En muchas ocasiones pueden representar simples cambios transitorios del epitelio cervical debidos a infección por HPV. El problema se plantea por la elevada prevalencia de la infección por HPV, que en mujeres jóvenes oscila entre el 20 y el 46% según diversos estudios. La corta duración de la mayoría de estas infecciones, con una duración media de 8 meses²⁰, sugiere que debería te-

nerse una conducta conservadora ante las L-SIL, esperando su regresión espontánea. Por otra parte, se sabe que sólo un 10-20% de estas lesiones progresan^{21,22}. Los estudios sobre la historia natural de la infección por HPV, mediante técnicas moleculares, han permitido establecer que es necesaria la infección persistente por tipos de HPV de alto riesgo oncogénico para la progresión a una lesión escamosa de alto grado (H-SIL) y su mantenimiento^{20,23}.

Mikail et al¹⁸ realizaron un estudio clínico prospectivo en pacientes afectadas de CIN-I, en las que se controló durante un año el tamaño lesional con COD, evidenciando una elevada tasa de regresión, lo que permitió evitar la terapia activa en el 64% de casos y la repetición de la biopsia en el 95%. La observación de la CIN sin tratamiento está especialmente justificada durante el embarazo. Los mismos autores han estudiado con COD la evolución del tamaño de la imagen colposcópica atípica en un grupo de 41 mujeres gestantes¹⁹. Sólo las lesiones que aumentaron de tamaño (17,1%) fueron biopsiadas, demostrándose en las mismas una CIN-III. Cuando el tamaño permanecía estable (21,9%) o disminuía (41,5%) fueron biopsiadas en el posparto y se correspondían con CIN-II, CIN-I o eran negativas. Finalmente, en 8 mujeres (19,5%) la lesión desapareció. Con este proceder se evitó un 82,9% de biopsias durante el embarazo. Estos trabajos apoyan que la evolución del tamaño de la lesión es un criterio adecuado para valorar la progresión o regresión de la CIN.

Ante una citología de L-SIL se debe practicar una colposcopia y eventual biopsia para excluir la presencia de lesiones más avanzadas. En su ausencia, puede ser adecuado realizar un seguimiento de 24 meses antes de plantear un tratamiento definitivo. De esta forma, se ha comunicado la regresión espontánea en un 81,1% de las pacientes con biopsia de L-SIL, evitándose un sobretratamiento innecesario²⁴. En nuestra opinión, el control sin tratamiento está indicado en las pacientes con diagnóstico de L-SIL por biopsia dirigida, que reúnen las condiciones señaladas en la tabla 4. El control de las pacientes se facilita en gran manera con la utilización de la COD, que permite el registro gráfico de las lesiones y la monitorización de su evolución mediante evaluación seriada. Los controles se realizan cada 6 meses durante 2 años, valorándose el área y las características lesionales. Si la lesión aumenta de tamaño

o presenta signos de agravación, se practica una nueva biopsia. Si la mujer no reúne las condiciones señaladas, y especialmente las mujeres mayores de 40 años con determinación de HPV de alto riesgo oncogénico positivo, se debe considerar su tratamiento mediante exéresis.

En conclusión, la colposcopia, además de guiar la pequeña biopsia para confirmar el diagnóstico, debe documentar con la mayor exactitud posible los hallazgos morfológicos, topográficos y morfométricos de las lesiones cervicales. Todo ello es posible con

el uso de la COD. El tamaño de la lesión y su localización topográfica se correlacionan con el grado de la CIN y con sus características morfométricas histológicas. Las características lesionales que se relacionan de forma significativa con la progresión de la CIN son aumento del tamaño lesional y localización central. El seguimiento del tamaño lesional, en pacientes seleccionadas con lesiones intraepiteliales de bajo grado, puede ser un buen marcador de su potencial evolutivo y su aumento un indicador pronóstico de progresión de posible aplicación clínica.

4'

BIBLIOGRAFÍA

1. Benedet JL, Bender H, Jones H III, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications in the management of gynecologic cancers. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 70: 209-262.
2. Puig Tintoré LM, Torné A. Colposcopia digital. Técnica, aplicaciones y perspectivas futuras. *Prog Obstet Ginecol* 1997; 40: 89-99.
3. Puig-Tintoré LM, Galcerán J, Torné A, Grau A, Puig Soler LM. Sistema integrado de base de datos clínicos e imágenes colposcópicas, en la prevención del cáncer del tracto genital inferior de la mujer. En: Roca Dorda J, editor. Libro de Actas, XVIII Congreso de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica. Cartagena, 27-29 septiembre 2000; 291-94 (ISBN: 84-699-311-3).
4. International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy IFCPC. International colposcopic terminology. Roma, Italia: mayo, 1990.
5. Burghardt E. Extent of Atypical Cervical Epithelium. En Burghardt E, editor. Early histological diagnosis of cervical cancer. Stuttgart: Thieme, 1973; 44-45.
6. Abdul-Karim FW, Fu YS, Reagan JW, Wentz WB. Morphometric study of intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1982; 60: 210-214.
7. Jarmulowicz MR, Jenkins D, Barton SE, Goodall AL, Hollingworth A, Singer A. Cytological status and lesion size: a further dimension in cervical neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 1061-1066.
8. Shafi MI, Finn CB, Luesley DM. Lesion size and histology of atypical cervical transformation zone. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 490-492.
9. Tidbury P, Singer A, Jenkins D. CIN3: the role of lesion size in invasion. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 583-586.
10. Brunton GF, Wheldon TE. The Gompertz equation and the construction of tumour growth curves. *Cell Tissue Kinet* 1980; 13: 455-460.
11. Kierkegaard O, Byrjalen C, Hansen KC, Frandsen KH, Frydenberg M. Association between colposcopic findings and histology in cervical lesions: the significance of the size of the lesion. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 66-71.
12. Furber SE, Weisberg E, Simpson JM. Progression and regression of low-grade epithelial abnormalities of the cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1997; 37: 107-112.
13. Torné A. Colposcopia digital en las lesiones premalignas de cuello uterino. Morfometría y análisis de imagen [Tesis doctoral]. Universidad de Barcelona, febrero, 2000.
14. Barton SE, Jenkins D, Hollingworth A, Cuzick J, Singer A. An explanation to the problem of false-negative cervical smears. *Br J Obstet Gynecol* 1989; 96: 482-485.
15. Buxton EJ, Luesley DM, Shafi MI, Rollason M. Colposcopically directed punch biopsy: a potentially misleading investigation. *Brit J Obstet Gynaecol* 1991; 98: 1273-1276.

- 6
16. Guijon E, Paraskevas M, McNicol P. Human papillomavirus infection and the grade of cervical intraepithelial neoplastic lesions associated with failure of therapy. *Int J Gynecol Obstet* 1993; 42: 137-142.
 17. Torné A, Puig Tintoré LM, Jou P, Sánchez E, Lejarcegui JA, Ordi J, Iglesias X. Risk factors associated with failure of laser therapy in cervical intraepithelial neoplasia. The role of human papillomavirus infection and lesion size. Abstracts 2nd International Congress of Papillomavirus in Human Pathology, París, 1994.
 18. Mikhail MS, Merkatz IR, Romney SL. Clinical usefulness of computerized colposcopy: image analysis and conservative management of mild displasia. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 5-8.
 19. Mikhail MS, Anyaegbunam A, Romney SL. Computerized colposcopy and conservative management of cervical intraepithelial neoplasia in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 376-378.
 20. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
 21. Östor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia -a critical review. *Ing J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-192.
 22. Syrjänen KJ. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 65: 45-53.
 23. Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999; 354: 20-25.
 24. Lee SSN, Collins RJ, Pun TC, Cheng DKL, Ngan HYS. Conservative treatment of low grade squamous intraepithelial lesion (SIL) of the cervix. *Int J Gynecol Obstet* 1998; 60: 35-40.