



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Coordinatore del Corso: Prof. Andrea Piana

CURRICULUM IN SANITÀ PUBBLICA

Responsabile di Curriculum: Prof. Andrea Piana

XXXII ciclo

Implementazione di nuove strategie diagnostiche per la prevenzione del cervico-carcinoma

Tutor:

Prof. Andrea Piana

Co-Tutor:

Prof. ssa Clementina Cocuzza

Dottoranda:

Dott.ssa Illari Sechi

A.A. 2019/2020

Indice

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 2 |
| 1.1. Epidemiologia del Cervico-carcinoma..... | 2 |
| 1.2. Caratteri generali e tassonomia del Papillomavirus umano (HPV) | 5 |
| 1.3. Classificazione in base al rischio oncogeno | 8 |
| 1.4. Ciclo replicativo, patogenesi e risposta immunitaria..... | 10 |
| 1.5. Definizione, classificazione ed evoluzione della patogenesi..... | 14 |
| 1.6. Interventi di prevenzione | 17 |
| 1.6.1. Vaccinoprofilassi anti-HPV | 17 |
| 1.6.2. Screening cervicale (Pap-test, HPV DNA test)..... | 19 |
| 1.7. Saggi molecolari e genotipizzazione dell'HPV..... | 30 |
| 1.7.1. Saggi per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno..... | 31 |
| 1.7.2. Saggi per end-point per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno..... | 34 |
| 1.7.3. Saggi per la rilevazione degli RNA messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7..... | 34 |
| 1.7.4. Ruolo della carica virale come marker di progressione neoplastica..... | 35 |
| 2. SCOPO DELLA RICERCA..... | 39 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 42 |
| 3.1. Popolazione in studio..... | 42 |
| 3.2. <i>Devices</i> impiegati e questionari di gradimento..... | 42 |
| 3.3. Processamento dei campioni biologici | 49 |
| 3.4. Estrazione acidi nucleici da campioni biologici | 49 |
| 3.5. Identificazione e quantificazione del DNA virale con OncoPredict DNA kit e genotipizzazione con Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene) in Real Time PCR..... | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RISULTATI..... | 59 |
| 4.1. Analisi della popolazione in studio..... | 59 |
| 4.2. Confronto tra i risultati ottenuti con i diversi dispositivi di auto-prelievo per la ricerca degli HPV e dei patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmesse..... | 59 |
| 4.2.1. Comparazione tra tampone cervicale vs <i>FLOQSwabs®/HerSwab™</i> | 60 |
| 4.2.2. Comparazione tra tampone cervicale vs <i>FLOQSwabs®/Evalyn®Brush</i> | 64 |
| 4.2.3. Analisi dei questionari di gradimento relativi all'utilizzo dei dispositivi di self-collection | 69 |
| 4.3. Validazione analitica del kit diagnostico OncoPredict su campioni cervicali (CCC), auto-prelievo vaginale (SV) e primo mitto di urina (FVU)..... | 73 |
| 4.3.1. Confronto tra il kit OncoPredict (SCR e QT1/4) e Anyplex™ II HPV28..... | 74 |
| 4.3.2. Performance analitica del kit OncoPredict nell'identificazione del genotipo-specifico di HPV da campioni cervicali (CCC), auto-prelievo vaginale (SV) e primo mitto di urina (FVU)..... | 76 |
| 4.3.3. Determinazione della carica virale genotipo-specifica in campioni CCC, SV e FVU..... | 80 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 83 |
| 6. CONSIDERAZIONI..... | 89 |
| 7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA..... | 93 |

PREMESSA

Secondo i dati GLOBOCAN 2018, il cervico-carcinoma è il quarto tumore più comune nelle donne e occupa il settimo posto a livello globale. La neoplasia è un esito raro di un'infezione molto frequente; ormai è ampiamente riconosciuto il ruolo cancerogeno dell'HPV identificato come fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo della neoplasia. Il DNA virale è individuato, infatti, in oltre il 99,7% dei casi di carcinoma cervicale (3,4).

L'implementazione dei programmi di screening e la campagna di vaccinazione rappresentano l'arma più efficace per ridurre la sua diffusione. In Italia, il Piano d'azione nazionale di prevenzione 2014-2018 ha dato indicazioni a tutte le regioni italiane di sostituire gradualmente il Pap test con HPV test per lo screening cervicale o di utilizzarlo nelle fasi intermedie di introduzione come criterio di triage in caso di anomalie citologiche di basso grado (45).

Nonostante i recenti miglioramenti nell'individuazione di biomarker molecolari nel rilevare precocemente la potenziale trasformazione maligna d'infezioni da HPV ad alto rischio (hrHPV), la ridotta adesione alla partecipazione ai programmi di screening rappresenta ancora un problema importante in diversi paesi, spesso a causa di costumi culturali, etici o religiosi.

L'auto-prelievo vaginale può rappresentare una soluzione ragionevole e valida per il superamento di queste barriere, aumentando così la compliance allo screening. Tra i metodi di auto-prelievo, oltre all'utilizzo di tamponi vaginali, va considerata anche la raccolta di campioni di urina, reputata culturalmente e religiosamente più accettabile rispetto al prelievo vaginale (58), considerata valida alternativa come fonte di biomarkers per gli hrHPV.

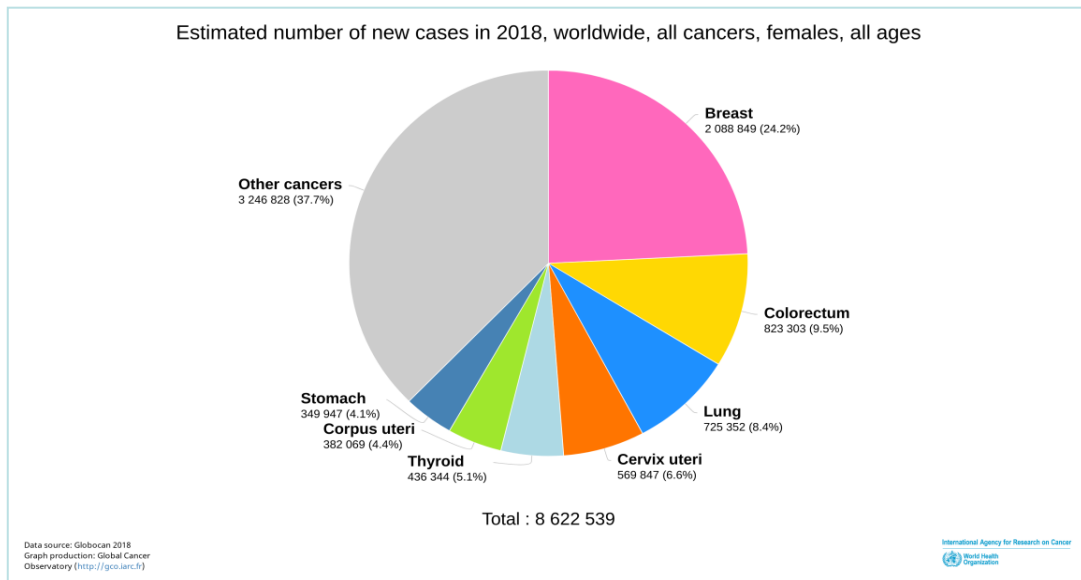
Oltre all'autoprelievo, recenti studi hanno evidenziato la possibilità di utilizzare ulteriori biomarker molecolari surrogati (identificazione di genotipi hrHPV, carica virale, metilazione dei geni virali e di quelli presenti nei tessuti colpiti da infezione, rilevamento di trascritti oncogeni) al fine di definire meglio il ruolo eziopatogenetico del virus, utile sia ai fini preventivi, diagnostici nonché prognostici e terapeutici.

1. INTRODUZIONE

1.1. Epidemiologia del Cervico-carcinoma

Il cancro alla cervice uterina (CervicalCancer, CC) è il primo tumore ad essere riconosciuto dalla World Health Organization (WHO) come totalmente riconducibile ad un'infezione; è il quarto tumore più comune nelle donne e il settimo complessivamente (Figura.1) (1).

Fig. 1. (Globocan 2018)



L'agente eziologico di questa neoplasia è il Papilloma virus umano trasmesso per via sessuale (2).

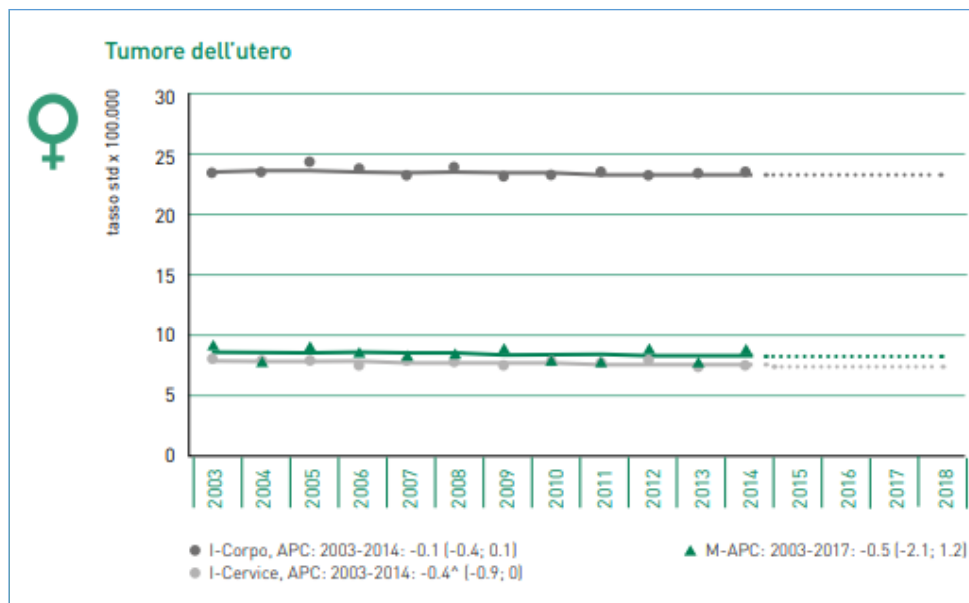
Il cervico-carcinoma è un esito raro di un'infezione molto frequente; ormai è ampiamente riconosciuto il ruolo cancerogeno dell'HPV identificato come fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo della neoplasia. Il DNA virale è individuato, infatti, in oltre il 99,7% dei casi di carcinoma cervicale (3,4). Il Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2016) ha stimato che il 50% dei nuovi casi di infezione/anno coinvolge i giovani di età compresa fra 15 e 24 anni, sebbene essi rappresentino solo il 25% della popolazione sessualmente attiva.

Il processo di cancerogenesi è di lunga durata e il carcinoma rappresenta la fase evolutiva finale di una serie di lesioni a rischio progressivamente più alto che, particolarmente nelle fasi iniziali, possono peraltro regredire spontaneamente. I fattori di rischio riguardano fondamentalmente tutte le condizioni di trasmissione del virus e di progressione delle lesioni pre-maligne. Queste condizioni sono favorite da basso livello socio-economico (con scarso accesso alla prevenzione), numero di partner, giovane età di inizio dell'attività sessuale e parità (5).

In Italia, nel 2018 sono stati circa 10.800 nuovi casi di tumore dell'utero, di cui 2.400 a carico della cervice uterina (pari a quasi il 2% di tutti i tumori incidenti nelle donne). Il tumore della cervice è più frequente nella fascia giovanile (4% dei casi, quinta neoplasia più frequente) mentre dopo i 50 anni rappresenta complessivamente l'1% dei tumori femminili (6).

Si stima che il rischio di sviluppare un tumore della cervice uterina nell'arco della vita di una donna sia di 1 su 158. Il trend di incidenza della cervice uterina appare in lieve riduzione (-0,4%/anno) (Figura.2).

Fig. 2. Tumore del corpo dell'utero e della cervice uterina. AIRTUM: stima dei trend tumorali di incidenza e mortalità (utero totale) 2003-2018. Tassi standardizzati nuova popolazione europea 2013.



APC = AnnualPercentChange (variazione percentuale media annua), I = incidenza, M = mortalità.

Nota: una quota rilevante dei decessi dovuti a tumori dell'utero sono codificati come utero NAS (non altrimenti specificato), per tale motivo si riporta nel grafico la mortalità della categoria 'utero totale', che include utero cervice, corpo e NAS.

L'incidenza presenta gradienti Nord-Sud, con valori leggermente inferiori nel meridione. Nel 2015 sono stati 2.951 i decessi per tumore dell'utero (2.516 per altre parti dell'utero e 435 per la cervice uterina) pari al 4% dei decessi per tumore nelle donne, senza significative differenze per fasce di età. Il rischio di mortalità per un tumore dell'utero totale (non specificato se corpo o cervice) è pari a 1 su 135, con un trend totale costante (Fig.2). Tuttavia, per quanto riguarda *la mortalità*, questa non presenta gradienti Nord-Sud. (6).

La *sopravvivenza* a 5 anni dei tumori del collo dell'utero è pari al 68%. La probabilità di sopravvivere altri 5 anni, avendo superato il primo anno dalla diagnosi è pari a al 75% e al 93% dopo 5 anni dalla diagnosi (7). La sopravvivenza a 5 anni mostra lievi differenze tra Nord e Sud. La sopravvivenza a 10 anni è pari al 61%(7).

In Italia, in relazione alla *prevalenza*, le donne che vivono con diagnosi di tumore del collo dell'utero sono circa 56.000. Il tasso di prevalenza è più alto nelle Regioni del Nord (8). Oltre l'80% dei casi prevalenti ha affrontato la diagnosi da oltre 5 anni. La proporzione maggiore di casi prevalenti si osserva nella fascia di età >75 (607/100.000) (8).

Dai dati GLOBOCAN 2018 (rapporto dell'Agencia internazionale per la ricerca sul cancro), sul cancro cervicale nel mondo, sono stati identificati 570.000 nuovi casi nel 2018, con la maggior parte dei casi nei paesi in via di sviluppo, con un'incidenza del 13.1 per 100.000 donne ed una mortalità del 6.9 per 100.000 donne (Figure 3-4).

Fig.3. Incidenza (Globocan 2018)

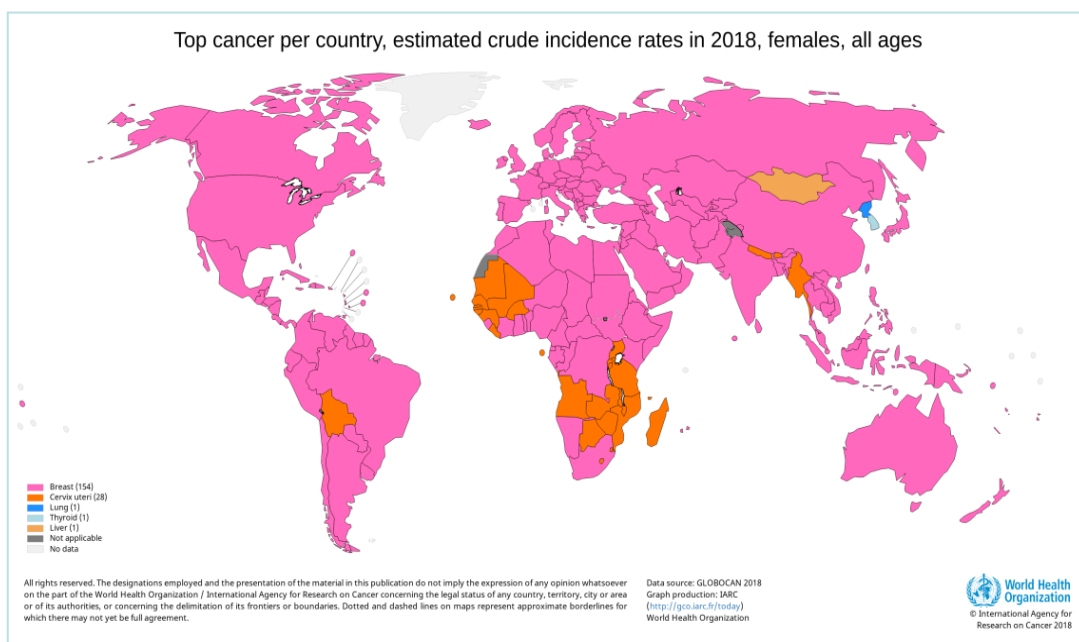
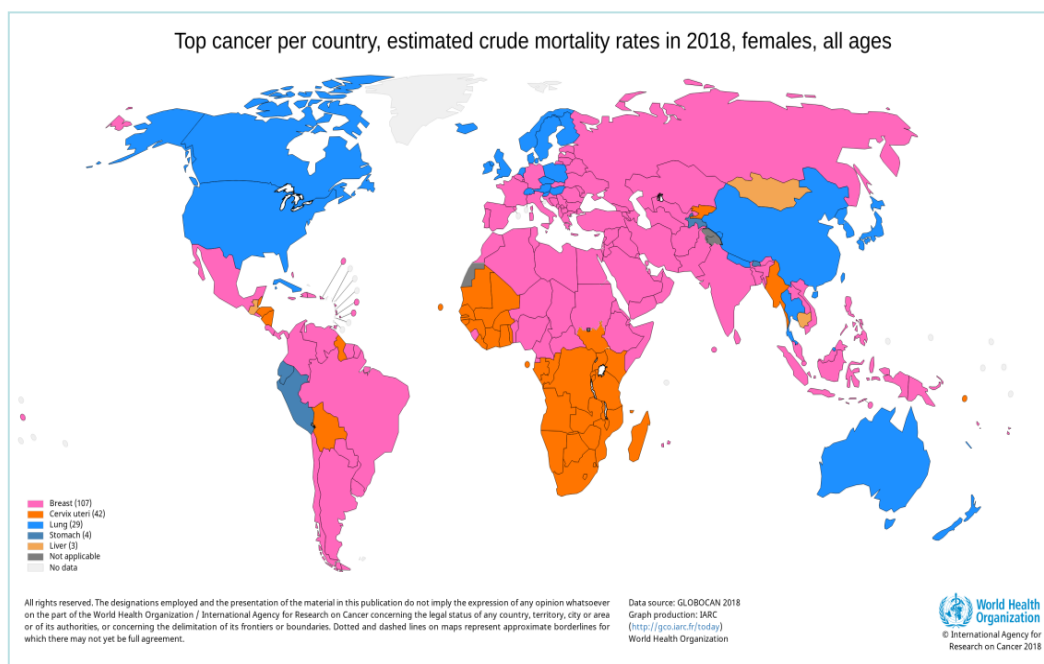


Fig.4. Mortalità (Globocan 2018)



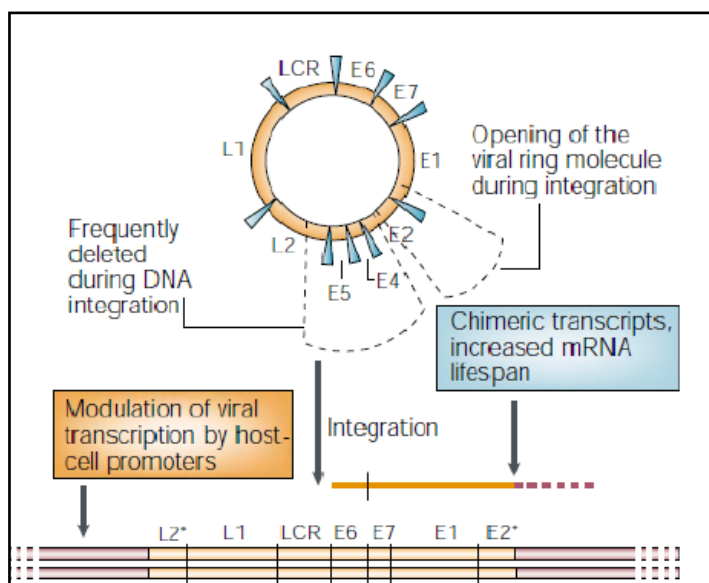
1.2. Caratteri generali e tassonomia del Papillomavirus umano (HPV)

L'ipotesi di una correlazione tra infezione genitale da HPV e neoplasia cervicale (9) è stata formulata per la prima volta agli inizi degli anni '80 dal virologo tedesco Harold zurHausen e confermata da numerose evidenze molecolari ed epidemiologiche nel corso degli anni successivi (3; 10).

I Papillomavirus sono piccoli virus specie-specifici appartenenti alla famiglia *Papilloviridae*, che infettano i tessuti epiteliali delle mucose e dell'epidermide, inducendo lesioni proliferative quali verruche, a livello di mani e piedi, e condilomi, a livello del tratto genitale, labiale e respiratorio (11).

Sono virus privi di envelope glicoproteico, con un capsido a geometria icosaedrica contenente una molecola di DNA circolare (Figura 5) a doppio filamento di circa 8 kb (9). A tutt'oggi sono stati identificati circa 200 differenti genotipi che infettano sia l'uomo, sia gli animali (12), 100 dei quali sono stati completamente sequenziati e caratterizzati.

Fig.5. Organizzazione del DNA circolare di HPV e integrazione nel DNA della cellula ospite (ZurHausen 2009)



Il genoma dell'HPV è costituito da geni espressi precocemente nel loro ciclo vitale (*Early*, E), coinvolti nei processi di regolazione del ciclo replicativo virale, e da geni tardivi (*Late*, L), che codificano per le proteine del capside:

- Tra i geni precoci (più del 50% di tutto il genoma): **E1** e **E2** sono coinvolti nella replicazione del DNA virale, nel mantenimento dello stato episomale e nella regolazione della trascrizione, in particolare E2 come repressore è molto importante nel regolare i livelli di espressione di E6 ed E7, le due principali oncoproteine di HPV (13); **E4** è coinvolto nella maturazione della particella virale: è in grado di interagire con i filamenti intermedi di cheratina, rendendoli meccanicamente instabili e facilitando così il rilascio dei virioni maturi dalla cellula epiteliale. **E5**, è una proteina trans membrana (14) partecipa, con le proteine E1, E2 ed E4, alla replicazione del DNA virale. Le proteine **E6** ed **E7** sono le principali responsabili della trasformazione cellulare e della progressione maligna del cancro cervicale e per questo sono definite proteine oncogene (15). L'azione oncogena delle proteine E6 ed E7 risiede nella capacità di inattivare due importanti proteine oncosoppressorie, la p53 e la proteina del retinoblastoma, pRb (16). E6 è in grado di interferire con le attività di diverse proteine cellulari, tra cui fattori di trascrizione, proteine pro-apoptotiche, coinvolte nella formazione e nel mantenimento dell'architettura cellulare, e fattori di replicazione e di riparo del DNA. E7, invece, è

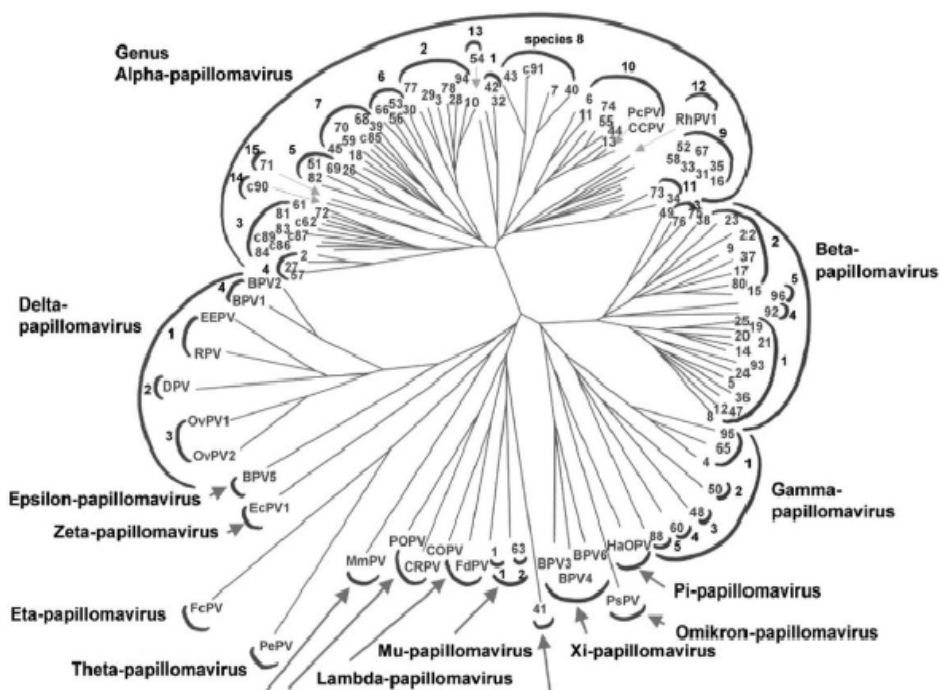
una fosfoproteina che si riscontra nel nucleo e nel citoplasma, interagisce con numerose proteine cellulari: fattori di trascrizione e proteine che rimodellano la cromatina, regolatori negativi del ciclo cellulare, e componenti della risposta immunitaria innata (17). Il ruolo principale di E7 riguarda la sua capacità di associarsi alla proteina soppressore del tumore pRb appartenente alla famiglia del retinoblastoma (Rb).

- Tra i geni tardivi (circa il 40% del genoma virale): **L2** codifica per la proteina capsidica minore mentre **L1** per la proteina capsidica maggiore; quest'ultima è la regione target per la maggior parte delle metodiche molecolari di rilevazione e genotipizzazione del virus;
- La Long Control Region (LCR, circa 10% del genoma virale) è una regione non codificante di circa 850 bp che contiene l'origine della replicazione/trascrizione e rappresenta il target per il legame con molti fattori proteici.

Attraverso l'analisi filogenetica dei papillomavirus umani e animali, sono stati distinti 16 generi, identificati con le lettere dell'alfabeto greco: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , ξ , \omicron , π .

I papilloma virus umani afferiscono ai generi α , prevalentemente mucosali e β , prevalentemente cutanei(18) (Figura 6).

Fig. 6. Classificazione filogenetica dei Papillomavirus (De Villiers et al, 2004)



L'ufficiale tassonomia dei Papillomavirus è basata sul confronto della sequenza nucleotidica del gene virale L1. Un genotipo di HPV si distingue rispetto ad un altro per sequenze nucleotidiche di L1 diverse per più del 10%. Ciascun genotipo di HPV è identificato da un numero. I tipi che differiscono per il gene L1 dal 2 al 10% sono rari e sono definiti "sottotipi" (13). In presenza di differenze geniche di L1 inferiori al 2% i tipi si definiscono "varianti" (19). Nell'uomo sono stati descritti più di 120 tipi, di cui 40 di essi infettano la mucosa genitale e molti altri sono stati identificati in mammiferi ed uccelli. Gli HPV correlati filogeneticamente sono raggruppati in cluster; tra i principali ritroviamo: il gruppo A9 che comprende i genotipi 16-31-33-35-52-58; il gruppo A7 con i genotipi 18-39-45-59-68; il gruppo A5 con i genotipi 26-51-69-82; il gruppo A6 con gli HPV 53-56-66.

1.3. Classificazione in base al rischio oncogeno

I vari genotipi di HPV attivi soprattutto a livello genitale sono classificati in basso e alto rischio oncogeno sulla base del rischio di sviluppare il cervico-carcinoma. *Muñoz e collaboratori, 2003* (20) hanno stilato una classificazione epidemiologica dei tipi di HPV in base al rischio oncogeno sulla base dei dati ottenuti da 11 studi caso-controllo, condotti tra il 1985 e il 1997 in 9 paesi diversi, coinvolgendo 1.918 donne con carcinoma squamo-cellulare (Squamous-Cell Carcinoma, SCC) istologicamente confermato e 1.928 controlli. Tale classificazione è stata prodotta calcolando la prevalenza di uno specifico tipo di HPV nei pazienti e nei controlli. Tale classificazione ha identificato 15 tipi ad alto rischio oncogeno (HR-HPV = 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 12 tipi a basso rischio oncogeno (LR-HPV = 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108) e tre tipi (26, 53, 66) a probabile alto rischio (IR-HPV) poiché rilevati in un terzo dei malati e in nessuno dei controlli (Tabella 1).

Tab.1. Classificazione in base al rischio oncogeno (Muñoz e collaboratori, 2003)

| RISCHIO ONCOGENO | GENOTIPO DI HPV |
|-------------------------------|--|
| Alto rischio | 16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-68-73-82 |
| Probabile alto rischio | 26-53-66 |
| Basso rischio | 6-11-40-42-43-44-54-61-70-72-81-CP6108 |

Nel 2012 lo IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato l'insieme dei genotipi per i quali era già stato dimostrato un coinvolgimento più o meno certo nella comparsa di cervico-carcinomi, sempre in tre gruppi basati sul rispettivo livello di rischio associato, ma con una differente classificazione (Tabella 2):

Tab.2. Classificazione in base al rischio oncogeno (IARC)

| Gruppo IARC (2012) | Genotipo HPV |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1 – Alto rischio | 16-18-31-33-35-39- 45-51-52-56-58-59 |
| 2A – Probabile rischio | 68 |
| 2B – Possibile rischio | 26-30-34-53-66-67-69-70-73-82-85-87 |
| 3 – Assenza di rischio | 6-11-42-43-44-54-55 |

A livello mondiale il 53%-68% circa dei carcinomi cervicali sono attribuiti al genotipo 16 e circa il 20% al genotipo 18, con scarse variazioni geografiche (20).

I genotipi ad alto rischio sono implicati nella carcinogenesi dei tumori del collo dell'utero e di altri tumori del tratto ano-genitale ed altre mucose; i genotipi probabilmente ad alto rischio sono coinvolti in lesioni di alto grado e carcinoma, ma il numero dei casi non è ancora sufficiente per essere inseriti nel gruppo ad alto rischio;

mentre quelli a basso rischio si associano quasi esclusivamente a lesioni benigne come i condilomi genitali (20).

1.4. Ciclo replicativo, patogenesi e risposta immunitaria

L'avvio del processo infettivo coincide con l'ingresso del virione all'interno di una delle cellule basali di un epitelio pluristratificato. Il tropismo estremamente selettivo dimostrato dall'HPV per questa categoria di epitelii rende indispensabile il contatto con una cellula staminale epiteliale, condizione che può essere ottenuta solo per effetto della presenza di microlesioni attraverso le quali il virus può raggiungere i cheratinociti dello strato basale. La giunzione squamo-colonnare dell'epitelio cervicale, a causa delle particolari caratteristiche istologiche, rappresenta una sede d'infezione particolarmente sensibile all'aggressione da HPV. Le cosiddette "cellule di riserva" presenti a livello della giunzione, sono cellule staminali totipotenti in grado di precedere la differenziazione sia come epitelio colonnare sia come epitelio pluristratificato. La prevalente comparsa di neoplasie in corrispondenza della giunzione squamo-colonnare si ritiene possa dipendere proprio dalle caratteristiche staminali delle cellule di riserva, condizione che le renderebbe incapaci di esercitare qualsiasi controllo sulla replicazione virale. In assenza di differenziazione, l'infezione delle cellule di riserva conduce alla comparsa di lesioni non produttive che possono poi evolvere verso una risoluzione spontanea, oppure dare origine a displasie più o meno marcate dalle quali può iniziare un processo di trasformazione neoplastica (21).

L'adattamento evolutivo di questo virus ha seguito in parallelo quello dei tessuti delle specie ospite. Le fasi della replicazione virale si sono quindi lentamente modellate sul ciclo di riproduzione degli epitelii bersaglio, pertanto il virus non può infettare cellule che si trovino già nelle fasi successive della differenziazione, poiché la replicazione del virus, per potersi completare efficacemente, deve inserirsi nel processo di differenziazione cellulare a partire dallo stadio iniziale. Le cellule dello strato basale sono le uniche in grado di dividersi, quindi le sole adatte a consentire l'induzione di una lesione persistente. I meccanismi di interazione fra il capsido del virus HPV e la membrana cellulare sono tuttora poco noti. Le attuali conoscenze suggeriscono la possibilità che la proteina L1 eserciti un ruolo primario nel processo di adesione del

capside alla parete cellulare, tuttavia sono ancora molto ridotte le informazioni disponibili sul processo di endocitosi del virione.

Una volta internalizzati, i virioni sono trasportati all'interno di fagosomi con il possibile coinvolgimento di microtubuli e microfilamenti. La separazione del DNA virale dal capsido e la migrazione verso il nucleo appare mediata dalle proteine L1 ed L2 in base a segnali di localizzazione nucleare. L'ipotesi sembra confermata dalle osservazioni di microscopia elettronica che non rilevano la presenza di virioni completi all'interno dei nuclei.

Il ciclo di riproduzione del virus può essere suddiviso in due fasi: *stadio non produttivo* o *precoce* e *stadio produttivo*. Entrambe le fasi sono strettamente correlate al processo di differenziazione della cellula ospite. Una volta raggiunto il nucleo, il DNA virale attiva l'espressione dei geni precoci avviando la replicazione del proprio DNA in sincronia con quella del DNA della cellula ospite. Una prima serie di repliche, dell'ordine di alcune decine di copie, viene completata e conservata in forma episomiale. La trascrizione di alcuni geni precoci (E5, E6 ed E7) innesca alcune trasformazioni che provocano una proliferazione laterale della cellula infetta. Le repliche del DNA virale si distribuiscono uniformemente nelle cellule generate dal cheratinocita basale infetto, consentendo la creazione di una riserva infettiva persistente attraverso la generazione di un nucleo di cheratinociti basali costantemente occupati dal virus. Attraverso la riproduzione e la differenziazione cellulare dei cheratinociti infetti, il virus seguirà le cellule che si separano per procedere verso gli strati più esterni senza scomparire dallo strato basale. Alcuni studi sembrano indicare il possibile intervento di una reazione difensiva della cellula ospite in corrispondenza dell'espressione dei geni virali precoci. La presenza di DNA virale metilato nelle cellule infette, si ritiene possa essere la conseguenza di un'azione antagonista finalizzata a reprimere la trascrizione e la replicazione (22).

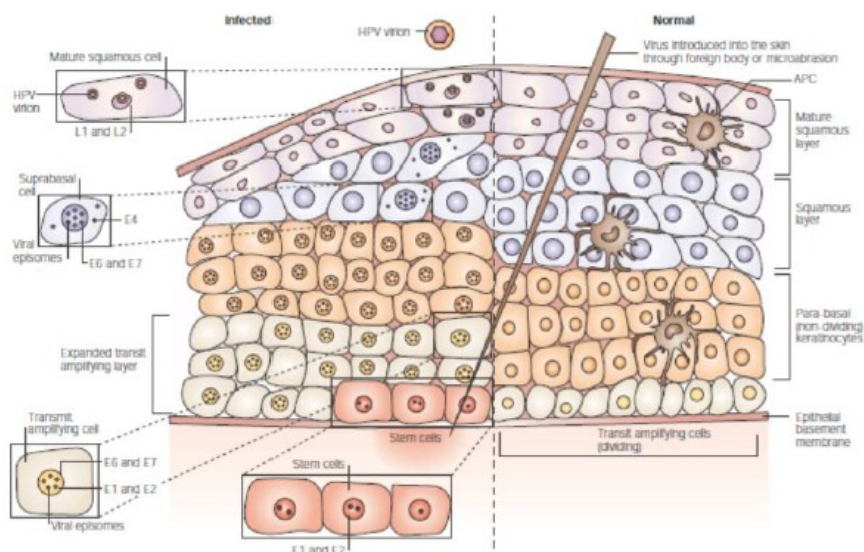
Il DNA virale può permanere all'interno della cellula ospite in forma di episoma, oppure può essere integrato nel DNA cellulare. Il mantenimento del DNA virale in forma episomica, conduce alla produzione di virioni completi, quindi di particelle virali mature in grado a loro volta di indurre processi infettivi. Questa condizione è presente nelle infezioni a basso o medio rischio e nelle lesioni di grado inferiore generate da HPV ad alto rischio. Nelle lesioni di grado elevato indotte dai virus ad alto rischio, il DNA virale è integrato nel DNA cellulare e non ha luogo la generazione di virioni

completi. L'integrazione del DNA virale è lo stadio iniziale del processo di trasformazione e di immortalizzazione cellulare che possono innescare l'evoluzione neoplastica della lesione. In alcuni casi, i tessuti infetti possono presentare DNA virale sia in forma episomica sia in forma integrata.

È stata dimostrata l'esistenza di un'infezione latente da HPV che inizia con la sintesi di una singola replica di DNA virale dopo l'internalizzazione del virione. L'episoma generato in questa condizione può permanere in uno stato silente per un periodo che può variare da 8 mesi a 10 anni, senza indurre nella cellula modificazioni o manifestazioni citotossiche. Non è noto quale ruolo rivesta il mantenimento dell'infezione allo stato latente.

L'avvio della fase produttiva dell'infezione coincide con l'inizio della migrazione delle cellule dello strato basale verso gli strati più esterni dell'epitelio. La replicazione del DNA si interrompe e si verifica una progressiva attivazione dei geni tardivi per la traduzione delle proteine strutturali dei capsidi. Durante la migrazione delle cellule differenziate, le copie di DNA virale generate nella precedente fase non produttiva, subiscono un processo di amplificazione che conduce alla genesi di migliaia di copie per cellula. Negli strati superiori dell'epitelio si completa l'assemblaggio dei capsidi, l'inclusione del DNA ed il successivo rilascio dei virioni nello spazio extracellulare (Figura 7).

Fig. 7. Espressione dei geni virali nella differenziazione delle cellule epiteliali (Frazer, 2004).



Una rilevante e complessa caratteristica delle infezioni da HPV è data dalla capacità di attuare strategie evasive in grado di eludere le difese immunitarie dell'ospite. In sintesi, l'HPV resta invisibile al sistema immunitario per tempi estremamente lunghi. Nel caso di infezioni persistenti che presentino almeno due test positivi per lo stesso genotipo di HPV a distanza di 6 mesi, la sierconversione si rileva frequentemente a partire da 6 fino 18 mesi dalla data del primo rilevamento del DNA virale. In accordo con questa osservazione, le infezioni transitorie si accompagnano soltanto raramente alla comparsa di sierconversione (23). I meccanismi attraverso i quali l'HPV riesce ad instaurare e mantenere questa condizione difensiva sono tuttora oggetto di studi immunologici. In maniera schematica, gli elementi chiave di questa particolare interazione fra sistema immunitario ed HPV possono essere così riassunti:

- Il ciclo di vita strettamente intracellulare è già di per sé stesso una strategia evasiva. Il virus non causa citolisi e viene rilasciato attraverso la naturale desquamazione dei cheratinociti, cellule fisiologicamente destinate a morire. La produzione dei virioni si completa nei cheratinociti in fase terminale. Di conseguenza, la mancata alterazione del normale processo di differenziazione e morte dei cheratinociti non innesca segnali di pericolo e rilascio di citochine nel sito d'infezione. A questo si aggiunge una modifica mirata nell'espressione delle chemochine e citochine nelle cellule basali infette, impedendo l'interazione con gli effettori del sistema immunitario.
- Le caratteristiche del processo infettivo evitano l'entrata in contatto del virus con le strutture linfonodali, condizione che ostacola l'attivazione della risposta immunitaria.
- L'endocitosi del capside virale è un comune segnale di attivazione delle cellule dendritiche, tuttavia si è riscontrato che le cellule di Langerhans non sono attivate dall'interazione con i capsidi dell'HPV (la causa potrebbe risiedere in una riduzione del fattore TNF- α necessario per l'attivazione delle cellule di Langerhans). Test di incubazione con virus likeparticles (VLPs) strutture capsidiche composte solamente dalla proteina strutturale L1, hanno mostrato assenza di avvio della risposta immunitaria contro gli antigeni L1. Le cellule dendritiche stromali risultano invece reattive nei confronti delle VLPs, stimolando cellule T specifiche per l'HPV (23). L'alterazione del comportamento delle cellule di Langerhans, unita all'azione repressiva esercitata dal virus sull'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità cellulare di classe I

(MHC-I), alterano il processo di presentazione dell'antigene necessario per attivare la risposta immunitaria.

- Meccanismi di interferenza con l'alpha/beta interferone sono stati chiamati in causa da alcune ricerche nell'ambito dei possibili meccanismi di soppressione della risposta immunitaria attuata dall'HPV.

1.5. Definizione, classificazione ed evoluzione della carcinogenesi

Come è noto, il carcinoma cervicale è preceduto da una fase pre-tumorale o pre-invasiva più o meno lunga, che può essere individuata mediante l'esame citologico delle cellule cervicali esfoliate (Pap test) e confermata mediante l'esame istologico (biopsia) di tessuto cervicale. Il modello oncogenetico, secondo cui il cervico-carcinoma si sviluppa progressivamente attraverso varie lesioni intraepiteliali definite "precursori", si basa su precise relazioni di ordine temporale, spaziale, morfologico, clinico e biologico tra i precursori stessi e il carcinoma. Le lesioni pre-tumorali, infatti, precedono lo sviluppo della neoplasia invasiva, sono adiacenti ad essa, presentano analogie cito-istologiche, gli stessi fattori di rischio, e hanno un progressivo potenziale di invasività (24; 25).

Il norvegese Ralph Richart propose nel 1967 una classificazione denominata CIN (Neoplasia Intraepiteliale Cervicale) in cui le lesioni vengono suddivise in tre gradi: CIN1 o displasia lieve (coinvolgimento del terzo inferiore dell'epitelio, con strati superficiali regolari), CIN2 o displasia moderata (coinvolgimento dei 2/3 inferiori dello spessore epiteliale), e CIN3, comprendente la displasia severa e il carcinoma in situ (CIS) (distribuzione a tutto spessore delle atipie cellulari). Sulla base delle maggiori conoscenze acquisite sulla storia naturale della neoplasia, le CIN possono essere distinte in CIN1 da un lato e CIN2-3 dall'altro, secondo un modello dualistico basato sulle diverse potenzialità evolutive delle lesioni cervicali in senso tumorale (25).

Il sistema di refertazione e classificazione dei reperti citologici cervicali, analizzati al Pap test, attualmente in uso è il Sistema Bethesda del 2001(26). Tale classificazione

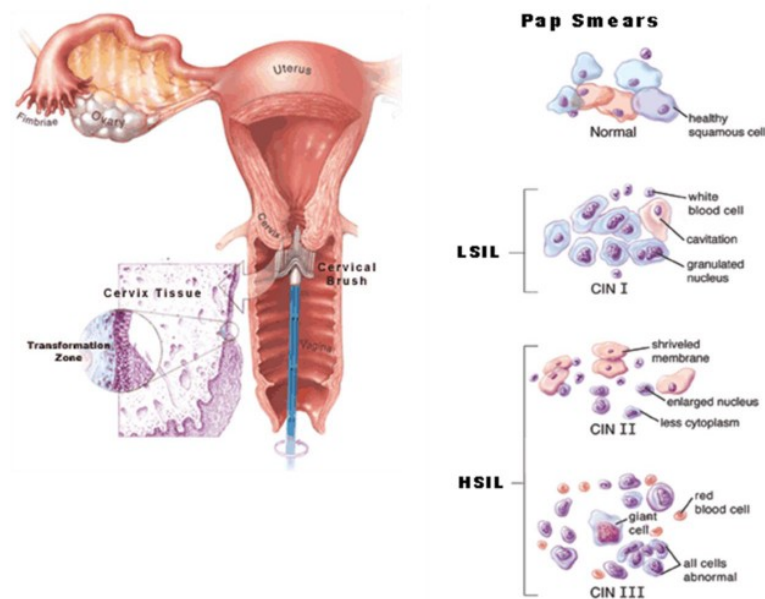
tiene conto di tutti gli aspetti citologici, da quelli infiammatori e infettivi a quelli displastici e neoplastici, ed anche dell'adeguatezza del prelievo.

Sulla base del Sistema Bethesda i risultati sono raggruppati in:

- ❖ Normali.
- ❖ Infezioni.
- ❖ Lesioni reattive e riparative.
- ❖ Lesioni intraepiteliali squamose di basso grado (L-SIL): presenza di alterazioni delle cellule della cervice uterina di basso grado, che comprendono anche le atipie coilocitiche (modificazioni cellulari HPV correlate). Regrediscono nella maggior parte dei casi.
- ❖ Lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (H-SIL): presenza di alterazioni delle cellule della cervice uterina di alto grado. Presentano un alto potenziale evolutivo verso il carcinoma invasivo, inversamente correlato alla possibilità di regressione.
- ❖ Cellule squamose atipiche (ASC) di significato indeterminato (ASC-US).
- ❖ Cellule squamose atipiche per cui non è possibile escludere H-SIL (ASC-H): diagnosi di incerta interpretazione che indica cellule atipiche a livello della superficie del collo dell'utero che non rientrano né nelle lesioni reattive né nelle lesioni classificate come L-SIL.
- ❖ Carcinoma squamo-cellulare (SCC).
- ❖ Adenocarcinoma endocervicale in situ, adenocarcinoma (AIS)
- ❖ Cellule ghiandolari atipiche (AGC), suggestive di neoplasia: sono diagnosi di incerta interpretazione che indicano cellule ghiandolari atipiche provenienti dalla cervice uterina.

ASC-US, L-SIL, ASC-H e H-SIL sono considerate le lesioni potenzialmente pre-neoplastiche (Figura 8).

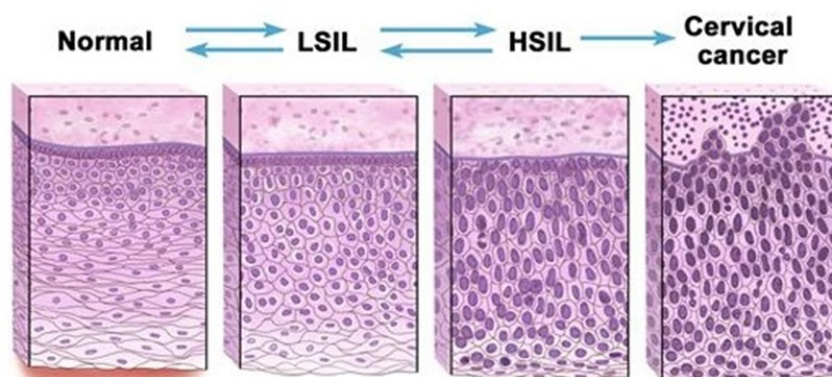
Fig.8.Sito del prelievo citologico e relative alterazioni rilevabili al Pap test e all'esame istologico.



L'evoluzione delle lesioni intraepiteliali prevede la progressione verso una lesione più grave o verso la neoplasia invasiva, la persistenza o la regressione verso la normalità o una lesione meno severa (24). La maggior parte delle infezioni sono transitorie anche quando sono sostenute da genotipi oncogeni, il riscontro clinico di una tendenza alla risoluzione spontanea anche nel caso di infezioni sostenute da genotipi HPV oncogeni, suggerisce la necessaria compresenza di altri fattori affinché il processo infettivo possa generare nel tempo la comparsa di una neoplasia cervicale (fattori genetici, immunitari, farmacologici, coinfezioni, fumo).

Come precedentemente affermato, è stato stimato che la neoplasia intraepiteliale cervicale richieda in media almeno 10 anni per diventare invasiva, con un intervallo di 3-15 anni in base alla gravità delle lesioni e all'età delle pazienti. Tale ipotesi è supportata dal fatto (25) che l'incidenza della CIN3 è maggiore in donne più giovani (età media 35 anni) di 10-15 anni di quelle con carcinoma invasivo (età media 50 anni) (Figura 9).

Fig.9.Classificazione delle lesioni intraepiteliali



1.6. Interventi di prevenzione

Gli interventi di prevenzione adottati per il tumore al collo dell'utero, si suddividono in due tipi: tipo primario e secondario.

Il primo consiste nella vaccinoprofilassi anti-HPV, il secondo nell'esecuzione di programmi di screening cervicale (27).

1.6.1. Vaccinoprofilassi anti-HPV

Anche se negli ultimi vent'anni, grazie ai programmi di screening, la mortalità per il cervico-carcinoma si è notevolmente ridotta, la vaccinazione anti-HPV può contribuire ulteriormente a ridurre l'impatto. Infatti, l'eziologia infettiva del cervico-carcinoma consente di adottare una strategia preventiva non utilizzabile per nessun tumore, grazie ai tre diversi vaccini (bivalente, quadrivalente e 9-valente) che contribuiscono a prevenire le patologie HPV-correlate. In ogni caso, il vaccino anti-HPV non sostituisce lo screening per il carcinoma della cervice uterina, previsto in Italia per le donne di età compresa tra i 25-64 anni (28).

La vaccinazione contro l'HPV è in vigore dal 2006 e i tre vaccini attualmente disponibili sono composti da proteine capsidi ricombinanti HPV L1 che si auto-assemblano in VLPs (virus likeparticles, VLP) e inducono la produzione di anticorpi di alto livello, neutralizzanti, di tipo specifico, suscitando una forte risposta immunitaria mediata da cellule B (29). Tutti e tre i vaccini sono somministrati con due dosi (2 dosi nel corso del 12° anno di vita) in un periodo di tempo di sei mesi e la risposta immunitaria alla vaccinazione è superiore alla risposta all'infezione naturale, fornendo così un'immunità a lungo termine (30).

Il vaccino bivalente prodotto dalla GlaxoSmithKline (Cervarix®), contiene le proteine L1 di HPV 16 e 18, prodotte separatamente in cellule di insetto usando come vettore il baculovirus e poi combinate con l'adiuvante AS04 (idrossido di alluminio e monofosforil-lipide A). Va somministrato intramuscolo in tre dosi (tempo zero, uno e sei mesi).

Il vaccino quadrivalente Gardasil® prodotto dalla Merck & CO. contiene le proteine L1 di HPV 6, 11, 16, 18. Il prodotto si somministra intramuscolo al tempo zero, due e sei mesi. I vaccini profilattici inducono la produzione di anticorpi neutralizzanti tipo specifici, che prevengono l'infezione in chi non è ancora stato infettato.

Nel 2014, la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato l'ultimo vaccino HPV, Gardasil 9®, che protegge da 9 HPV, tra cui HPV16, 18, 6, 11, 31, 33, 33, 45, 52 e 58. I cinque genotipi HPV aggiuntivi nel Gardasil 9®, proteggono un ulteriore 15-20% dei casi di cancro al collo dell'utero (31).

Come risultato, la vaccinazione ha il potenziale per prevenire il 90% dei casi di cancro della cervice uterina.

In Italia, il Ministro della Salute nel 2007 ha indicato la necessità di intervenire, in via prioritaria, con una campagna di vaccinazione gratuita per ragazze in età prepubere (12 anni) in modo da produrre una progressiva immunizzazione della popolazione giovane adulta esposta al rischio di infezione.

L'ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) raccomanda anche la vaccinazione per le femmine di età 13-26, per i maschi di età 13-21 e per gli uomini che

hanno rapporti omosessuali fino a 26 anni, così come per gli individui immunocompromessi non precedentemente vaccinati (32).

Le tre diverse tipologie di vaccino hanno dimostrato una efficacia molto elevata nel proteggere le vaccinate da infezioni cervicali persistenti per i tipi HPV 16 e 18 e dalle lesioni pre-cancerose (CIN 2+) sostenute da HPV 16 e 18. Inoltre, il vaccino quadrivalente protegge le donne anche dalle lesioni condilomatose indotte dagli HPV 6 e 11 (33;34). Tuttavia, dato che questi vaccini sono profilattici, sono progettati per prevenire l'infezione da HPV e non sono (o lo sono poco) efficaci una volta che l'infezione da HPV è già stata stabilita, di conseguenza diversi vaccini terapeutici, sono stati progettati, con lo scopo di stimolare la risposta immunitaria linfociti T-mediata contro le oncoproteine virali E6 ed E7 (35).

1.6.2. Screening cervicale (Pap-test, HPV DNA test)

Tra tutti i tumori maligni il tumore cervicale è uno dei più efficientemente controllati tramite l'applicazione di metodiche di screening. Il lungo intervallo tra la fase pre-neoplastica e la fase invasiva consente di effettuare un'efficace prevenzione tramite lo screening citologico (*Pap test*). L'introduzione di un test citologico mirato alla ricerca di alterazioni morfologiche in grado di evidenziare modificazioni epiteliali a rischio oppure trasformazioni neoplastiche in fase precoce, fu realizzata dal patologo Giorgos Papanicolaou nel 1950 prima che le ricerche accertassero l'esistenza di un legame eziologico fra HPV e carcinoma della cervice (Harold ZurHausen, 1976).

Il *Pap-test* consiste in un prelievo di una piccola quantità di cellule del collo dell'utero, eseguito strofinando sulle sue pareti una spatolina e un tampone. Le cellule prelevate, dopo essere state sottoposte a un particolare processo chimico, vengono analizzate al microscopio per valutare la presenza di alterazioni, che possono essere indice di una trasformazione in cellule tumorali. Se il Pap-test non evidenzia nessuna anomalia, la donna viene invitata a ripetere l'esame dopo tre anni.

Il prelievo delle cellule cervico-vaginali è un esame semplice e non invasivo, è eseguito durante la visita ginecologica. Viene prelevata, sia dall'esocervice, sia dall'endocervice,

con la spatola di Ayre e cytobrush, del materiale contenente cellule esfoliative che, strisciate su di un vetrino ed appositamente colorate, vengono poi osservate al microscopio (36). La spatola ha una forma complementare all'anatomia della cervice e una volta inserita è in grado di prelevare le cellule grazie a una rotazione di 360°; il tampone invece preleva esattamente le cellule dall'endocervice penetrando nell'orifizio uterino esterno. Un'altra modalità di raccolta delle cellule utilizza un mezzo liquido per la conservazione delle cellule, es. ThinPrep®. Una volta effettuato il prelievo, il ginecologo stempera le cellule in una soluzione fissativa alcolica, liquido di conservazione, evitando di farle “aggregare” disordinatamente e conservando pressoché tutto il materiale prelevato. In laboratorio, le cellule in sospensione vengono raccolte sulla superficie di una membrana, allontanando il materiale non necessario, come sangue e muco. Con questo metodo le cellule in sospensione vengono raccolte tramite aspirazione sulla superficie di una membrana e poi trasferite su vetrino. I dati disponibili dimostrano una riduzione della percentuale di risultati inadeguati con la citologia in fase liquida rispetto a quella tradizionale (37). L'utilizzo della citologia in fase liquida permette inoltre la conservazione e stabilità del Dna a temperatura ambiente, rendendo possibile allestire un secondo campione dal liquido rimasto oppure utilizzare il materiale residuo per effettuare ulteriori indagini di approfondimento (ricerca DNA-HPV) senza dover richiamare la paziente (37). Indipendentemente dal tipo di allestimento, le cellule vengono quindi colorate secondo il metodo di Papanicolau ed esaminate al microscopio da un citologo o patologo che provvederà a stilare un referto. Il referto viene comunicato con una sintetica descrizione dello stato delle cellule (Sistema Bethesda 2001)(37).

In caso di test negativo, la donna potrà ripetere il test dopo 3 anni; le donne che presentano alterazioni citologiche vengono invece inviate a eseguire un esame di approfondimento che, di regola, è la colposcopia. I criteri di invio a colposcopia cambiano in parte da Paese a Paese, anche in funzione della disponibilità di tale esame. Le donne con lesioni squamose intraepiteliali di alto grado (HSIL) vengono universalmente inviate a colposcopia. A livello internazionale le donne con lesioni di basso grado (LSIL) vengono di regola invitate a ripetere la citologia a intervalli generalmente di 6 mesi – 1 anno e inviate a colposcopia solo in caso di persistenza delle alterazioni. Lo stesso tipo di gestione è stata utilizzata per molti anni per le donne con

citologia di atipie squamose di incerto significato (ASC-US), per le quali si è recentemente diffuso l'utilizzo del triage con test HPV. In Italia è frequente l'invio diretto a colposcopia delle donne con citologia LSIL e ASC-US. La colposcopia è un esame della cervice uterina effettuato con uno strumento a basso ingrandimento. La sua funzione principale è guidare l'esecuzione di biopsie. Un numero elevato di CIN2 e 3 viene individuato da biopsie random, complementari alle lesioni individuate da biopsie mirate colposcopicamente (38).

Le donne con CIN2 o 3 confermate istologicamente vengono usualmente sottoposte a trattamento. Per la sensibilità non ottimale e per la scarsa accuratezza diagnostica nel discriminare le lesioni a basso rischio oncologico, la citologia deve essere affiancata da una metodica di secondo livello (livello successivo di approfondimento diagnostico) come colposcopia, biopsia o ricerca del DNA virale dell'HPV. La sensibilità della citologia convenzionale è stata stimata soprattutto attraverso studi basati sul doppio test (citologia e HPV) sulle stesse donne, da cui emerge che la sensibilità della citologia è del 53% e aumenta con l'età (da 48,7% sotto i 35 anni a 79,3% sopra i 50). La specificità è piuttosto alta (98% circa; ciò significa che soltanto nel 2% circa dei casi, la positività del test non viene confermata dalle indagini successive). Alcuni errori sono relativi alla fase di prelievo, mentre altri alle fasi di trasporto e conservazione; non mancano infine errori relativi alla fase di lettura (38). L'intervallo di screening deve essere di almeno 5 anni. Ci sono, infatti, prove che il rischio di CIN di alto grado fino a 5 anni dopo un test HPV negativo è inferiore a quello fino a 3 anni dopo una citologia normale (39).

È emerso da alcuni studi che un'infezione da HPV16/18 può progredire verso CIN2/3 o cancro entro 36-120 mesi (40; 41). In letteratura sono riportati casi di giovani donne che hanno sviluppato una neoplasia invasiva nonostante lo screening citologico negativo (42). Pur considerando la possibilità di Pap test falsi negativi, è ragionevole ritenere che in alcune situazioni si verifichi una rapida progressione, dell'ordine di mesi e non di anni, da epitelio metaplasico immaturo a CIN3 e da questo a carcinoma invasivo, bypassando le fasi descritte nella storia naturale del cervico-carcinoma. Dunque, considerando l'intervallo medio di progressione tra SIL e carcinoma di 10-15 anni, una quota limitata di casi si colloca agli estremi della curva, per cui da un lato esisterebbero casi di neoplasia dopo i 65 anni d'età, dall'altro casi con decorso particolarmente rapido, addirittura nell'intervallo tra due Pap test (5). I casi di displasie a progressione rapida,

HPV correlate, sono sostenuti da ceppi ad alto rischio oncogeno (in particolare HPV 16 e 18) e la rapidità di trasformazione dipende principalmente dalla persistenza dell'infezione virale, dall'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare e dall'espressione degli oncogeni E6 ed E7.

Dai dati Passi 2015-2018 risulta che in Italia l'80% delle donne fra i 25 e i 64 anni di età si sottopongono a scopo preventivo allo screening cervicale (Pap-test o Hpv test), all'interno di programmi organizzati o per iniziativa personale, secondo quanto raccomandato dalle linee guida nazionali, che suggeriscono alle donne di 25-64 anni di sottoporsi allo screening ogni tre anni per la diagnosi precoce del tumore della cervice uterina.

La quota di donne che si sottopone allo screening cervicale è maggiore fra quelle socioeconomicamente più avvantaggiate, per condizioni economiche o istruzione, fra le donne di cittadinanza italiana rispetto alle straniere, e fra le coniugate o conviventi rispetto alle donne non coniugate e non conviventi.

La copertura dello screening cervicale disegna un netto gradiente geografico Nord-Sud che divide l'Italia in due, con coperture mediamente pari al 87% nelle regioni del Nord Italia (90% nella P.A. di Bolzano o in Emilia-Romagna) e 69% nelle Regioni del Sud (con coperture minime per Calabria, 63% e Campania, 66%).

Nel tempo si registra un incremento statisticamente significativo della popolazione femminile che fa prevenzione, determinato da un aumento della copertura dello screening organizzato (mentre va riducendosi la copertura dello screening spontaneo). L'11% delle donne riferisce di non essersi mai sottoposta allo screening cervicale e il 9% di averlo fatto da oltre tre anni. La motivazione più frequentemente adottata dalle donne intervistate per la mancata esecuzione dello screening è l'idea di non averne bisogno.

Lo screening cervicale a scopo preventivo avviene per lo più nell'ambito di programmi organizzati dalle Asl (47%), mentre una quota inferiore, ma consistente, di donne (32%) fa prevenzione per iniziativa personale, fuori dai programmi organizzati dalle Asl, sostenendo del tutto o in parte il costo dell'esame.

La geografia della copertura dello screening organizzato riflette la geografia dell'offerta dei programmi: nelle Regioni dove l'offerta di programmi organizzati è maggiore

(prevalentemente quelle del Nord e del Centro Italia) è maggiore anche la quota di donne che fa prevenzione nell'ambito dei programmi organizzati, rispetto alla quota di donne che lo fa per iniziativa spontanea; di contro, nelle Regioni in cui l'offerta di programmi organizzati non è ancora sufficiente, o non raggiunge la totalità della popolazione femminile target (prevalentemente le Regioni meridionali), la situazione si inverte e talvolta la quota dello screening spontaneo è maggiore, o comunque rilevante, senza però riuscire a compensare la mancanza di offerta dei programmi, per cui il numero totale di donne che fa prevenzione (dentro o fuori i programmi organizzati) resta comunque più basso che nel resto del Paese.

Gli screening organizzati riducono le disuguaglianze sociali di accesso alla prevenzione: per la gran parte delle donne meno istruite o con maggiori difficoltà economiche o straniere, che meno frequentemente di altre si sottopongono allo screening cervicale, l'offerta di un programma organizzato rappresenta l'unica occasione di prevenzione del tumore della cervice.

L'intervento più efficace nel migliorare l'adesione allo screening, sembrerebbe essere l'invito da parte della Asl, associato al consiglio del medico/operatore sanitario(43).

Oggi, grazie a un lungo lavoro di studio e ricerca nazionale e internazionale, i programmi di screening italiani stanno adottando gradualmente l'*HPV test* al posto del Pap test, come nuovo test di screening per la prevenzione di questo tumore. Lo screening con test HPV, offerto alle donne di età dai 30-35 anni, insieme alla Vaccinazione anti-HPV offerta alle ragazze nel 12°anno di età, consente infatti di migliorare la lotta contro questa patologia.

Da quando la ricerca scientifica ha dimostrato che il test HPV è più efficace del Pap test per la prevenzione del cervico-carcinoma, in Italia sono stati avviati i primi programmi di screening con test HPV, un esame molecolare di laboratorio che consente di individuare la presenza del virus prima che provochi alterazioni nelle cellule. Il test HPV per essere efficace deve essere fatto all'interno di un programma organizzato che garantisce protocolli e controlli di qualità adeguati. In questo nuovo programma il Pap test diventa un esame di completamento (Pap test di triage) che viene eseguito solo nelle donne risultate positive al test HPV (44). Il test HPV ha una sensibilità maggiore rispetto

al Pap test, ossia è più efficace nel predire la possibilità di sviluppo di lesioni che potrebbero evolversi in tumori, ma meno specifico, vale a dire che identifica anche infezioni che potrebbero regredire spontaneamente. Pertanto, l'esame andrebbe riservato alle donne di età superiore ai 30 anni, poiché prima di questa età le infezioni da HPV sono molto frequenti, ma regrediscono spontaneamente in un'alta percentuale di casi e non evolvono quasi mai in tumore (27). Il carcinoma della cervice uterina è attribuibile nella quasi totalità dei casi (99%) ad HPV. In questo contesto solo l'infezione da HPV ad alto rischio (tipi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (38) ha rilevanza clinica, per cui il termine "Test HPV" nello screening indica la ricerca di sequenze dei soli HR-HPV.

Il nuovo Piano Nazionale della Prevenzione (PNP 2014-2018) prevede che le regioni riconvertano i loro programmi di screening dal pap test al test HPV per le donne al di sopra dei 30-35 anni di età entro il 2019, seguendo il protocollo definito nel rapporto di Health Technology Assessment (HTA) pubblicato nel 2012 (45). L'aggiornamento delle linee guida europee, pubblicato a settembre 2015 (46), prevede l'introduzione del test HPV di screening con un protocollo assolutamente analogo a quello riportato nel documento HTA italiano (46): test HPV da solo (non co-testing) e pap test di triage solo nelle donne HPV positive. Il protocollo applicato in Italia è più conservativo di quello delle linee guida europee. Il protocollo con test HPV primario nelle donne sopra i 30 anni prevede l'utilizzo di test clinicamente validati e la centralizzazione del test HPV e della citologia di triage in laboratori di grandi dimensioni. Attualmente, i test molecolari clinicamente validati al 28 dicembre 2018 sono 12, caratterizzati da diversa sensibilità, specificità e riproducibilità (Figura 10).

Fig.10. Documento ONS-GISCI “Test Validati per lo screening HPV” Rapporto n.4

Tabella 1 del Rapporto N. 4 - Test HPV clinicamente validati al 28 dicembre 2018

| TEST VALIDATO (NOME ABBREVIATO) | PRODUTTORE | METODOLOGIA | REFERENZE BIBLIOGRAFICHE degli STUDI DI VALIDAZIONE, area geografica, tipo di studio e mezzo di prelievo utilizzato negli studi di validazione | NOTE e COMMENTI |
|--|---------------------------|---|---|--|
| Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA test (HC2) | Qiagen, USA | Ibridizzazione con amplificazione del segnale | Test di riferimento usato in molti studi clinici randomizzati, compreso NTCC | |
| GP5+/6+ PCR-EIA (GP5+/6+ EIA) | Diassay, Olanda | PCR | Test di riferimento usato nel trial POBASCAM | |
| RealTime High Risk HPV test (Abbott RT hrHPV test) | Abbott, Germania | Real-time PCR | Carozzi et al, 2011 – Italia – retrospettivo / STM Poljak et al, 2011 – Slovenia – prospettico/ThinPrep Hesselink et al, 2013 – Olanda – retrosp. / non specificato | Test completamente validato. |
| Cobas 4800 HPV test (Cobas 4800) | Roche, USA | Real-time PCR | Heideman et al, 2011 – Olanda – retrosp. / UCM Lloveras et al, 2013 – Spagna – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| PapilloCheck HPV-screening test (PapilloCheck) | Greiner Bio-One, Germania | Tecnologia PCR – chip | Hesselink et al, 2010 – Olanda – retrosp. / PBS Heard et al, 2016 – Olanda – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato per la versione con 14 tipi di HPV. |
| Cervista HPV HR test (Cervista) | Hologic, USA | Tecnologia invader | Boers et al, 2014 – Cina, Olanda – prosp. / ThinPrep Alameda et al, 2015 –Portogallo–retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| BD Onclarity HPV assay (BD Onclarity) | BD Diagnostics, USA | Real-time PCR | Ejegod et al, 2014 – Danimarca, Inghilterra – retrosp. / ThinPrep Cuschieri et al, 2015 – Scozia – retrosp. / ThinPrep Ejegod et al, 2016 – Danimarca – retrosp. SurePath | Test completamente validato. |
| HPV-Risk assay (HPV-Risk assay) | Self-Screen, Olanda | Real-time PCR | Hesselink et al, 2014 – Olanda – prosp. / ThinPrep Polman et al, 2017 – Olanda/Slovenia – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| Anyplex II HPV HR Detection (Anyplex II) | Seegene, Korea | Real-time PCR | Hesselink et al, 2016 – Olanda – retrosp. / ThinPrep Jung et al, 2016 – Korea – retrosp. / Huro Path Ostrbenk et al, 2018 – Slovenia – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| Xpert HPV assay (Xpert) | Cepheid, USA | Cartridge-based real-time PCR assay | Cuschieri et al, 2016 – Scozia, Inghilterra – retrosp. / ThinPrep Akbari et al, 2018 – Belgio – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| RealQuality RQ-HPV | AB Analitica, Italia | Real-time PCR | Iacobellis et al, 2018 – Italia – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato. |
| EUROArray HPV | EUROIMMUN, Germania | PCR – probe-based microarray detection | Viti et al, 2018 – Slovenia (VALGENT 3) – retrosp. / ThinPrep | Test completamente validato per la versione con 14 tipi di HPV e solo se viene applicata la soglia per HPV16 ottimizzata anziché la soglia standard. |

*STM = Standard Transport Medium, Qiagen ThinPrep (TP) = PreservCyt, Hologic SurePath (SP) = BD Diagnostics PBS = Phosphate-Buffered Saline
UCM = Universal Collection Medium Huro Path = Huro Path solution, CellaZone

I laboratori hanno l’obbligo di partecipare a programmi di VEQ (Valutazione esterna di qualità) per tutti gli esami eseguiti e questo rappresenta anche un pre-requisito per i procedimenti di accreditamento e certificazione (ISO 15189). Le VEQ permettono di produrre dati che consentono al singolo laboratorio di confrontarsi con gli altri (accuratezza).

Scopi fondamentali dei programmi di VEQ sono la valutazione dell’uniformità dei risultati ottenuti in laboratori differenti e la valutazione comparativa di metodi analitici differenti. L’algoritmo di screening finora utilizzato prevede che le pazienti positive all’HPV DNA test eseguano la citologia di triage e le pazienti negative, verranno invitate a ripetere il test di screening dopo i cinque anni. Per quanto riguarda il pap-test di triage, se questo fosse negativo il protocollo prevede la ripetizione del test HPV a 1 anno e colposcopia in caso di persistenza dell’infezione HPV. Se il pap-test di triage fosse positivo, il protocollo prevede colposcopia immediata (Tabella 3).

Tab.3. Protocollo per lo screening cervicale con test HPV primario e citologia di triage (GISCI)

Il nuovo Programma di Screening con test HPV



Sebbene un aumento di sensibilità sia una proprietà importante nell’ambito di uno screening primario, il problema principale che affligge la prevenzione del cancro cervicale non riguarda le performance dei test ma il tasso di partecipazione ai protocolli di screening.

In Italia più di due terzi della popolazione femminile tra i 25-64 anni è coperta da programmi di screening che invitano le donne al controllo ogni 3 anni; la *compliance*, però, è relativamente bassa con circa il 40% delle donne che aderiscono (47). I principali ostacoli all’adesione allo screening riguardano: precedenti esperienze negative dell’utente (disagio o dolore durante una visita specialistica); sentimenti di imbarazzo e vergogna (48). Esperienze negative passate che possono scoraggiare le donne dal recarsi di nuovo da un operatore sanitario.

Per aumentare l’adesione ai programmi di screening, la maggior parte dei paesi industrializzati hanno ampliato i programmi di screening per la prevenzione del cervico-carcinoma, introducendo la metodica dell’auto-prelievo con l’obiettivo di raggiungere un maggior numero di utenti.

L'*Auto-prelievo* è una nuova metodica che consente alle donne di raccogliere in modo autonomo, semplice e affidabile i propri campioni per lo screening HPV; è stato studiato per essere accettabile dalle utenti e di facile utilizzo, in modo da poterlo utilizzare con minime istruzioni, così da raccogliere il materiale biologico più vicino alla cervice, dove è maggiore la possibilità di identificare ceppi dell'HPV e ridurre al minimo l'errore, durante il processo di raccolta. Rappresenta un metodo conveniente ed economico, ma soprattutto, un'ulteriore strategia per raggiungere le donne che non partecipano al regolare programma di screening (49). L'auto-prelievo per i test HPV è già stato adottato da alcuni paesi, mentre altri hanno avviato prove per valutarne l'integrazione nei programmi nazionali di screening del cervico-carcinoma. La sua importanza risiede nella possibilità di far aumentare la compliance allo screening, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, nei quali è elevato il numero delle donne che non accedono ai servizi di screening, ma anche nella capacità di eliminare molte delle barriere, in particolare quelle di tipo psicologico, che impediscono alle donne a parteciparvi regolarmente.

L'efficacia dell'auto-prelievo mediante tampone vaginale nel migliorare l'estensione dei programmi di prevenzione, ha incoraggiato la ricerca di nuove metodiche che consentano di rendere ancora più semplice il prelievo autonomo di campioni, con il duplice obiettivo d'incrementare ulteriormente la partecipazione allo screening e d'individuare nuovi biomarker dotati di maggior potere selettivo nel rilevare precocemente la potenziale trasformazione maligna d'infezioni da HPV ad alto rischio (hrHPV).

In uno studio del 2014 nei Paesi Bassi tra le 10.000 donne che hanno risposto a un questionario sul perché non avessero partecipato a precedenti screening cervicali, la maggior parte delle donne ha risposto di aver dimenticato di fissare un appuntamento; altri motivi pratici sono stati la gravidanza, l'allattamento o un trattamento di fertilità (50). La sottovalutazione del tempo trascorso dallo screening precedente è stata identificata come un altro fattore associato alla non partecipazione (51). In uno studio su oltre 3.000 donne norvegesi, l'offerta di materiali di auto-prelievo, invece di un invito per una visita medica a campione ha aumentato la partecipazione al 33,4 dal 23,2% (52). Analogamente, in uno studio condotto su 4.060 donne svedesi che non erano state

sottoposte a screening da almeno 6 anni, il 39% ha accettato un invito all'auto-prelievo e al test HPV (53).

Da qualche anno anche in Italia sono stati introdotti degli studi riguardanti l'utilizzo dell'auto-prelievo di campioni cervico-vaginali rivolto alle donne di 35-64 anni, che non hanno mai aderito allo screening.

Uno di questi studi, è stato condotto nell'arco di tre anni (2013 - 2016) in sei Aziende Sanitarie Locali del Veneto su di un campione costituito da 698 donne d'età compresa fra 30 e 64 anni che hanno risposto positivamente al reclutamento su un totale di 2300 inviti(54).

La proposta è stata rivolta a donne selezionate fra le partecipanti ad un precedente studio del 2011(55). La ricerca, svolta in due fasi, prevedeva l'esame del livello di partecipazione allo screening preventivo comparando tre gruppi di donne: al primo gruppo è stato inviato a domicilio un dispositivo di auto-prelievo vaginale, per il secondo gruppo è stato messo a disposizione il medesimo dispositivo presso una farmacia, il terzo gruppo (gruppo di controllo) è stato invitato per eseguire un test HPV standard presso le strutture delle ASL coinvolte nello studio.

I risultati hanno dimostrato la validità dei dispositivi di auto-prelievo nel ridurre il numero di donne scarsamente aderenti o non aderenti ai programmi di prevenzione. In particolare, lo studio ha confermato la maggior risposta del gruppo che ha impiegato i dispositivi inviati a domicilio rispetto al gruppo di controllo (44.6% contro 33.3% del gruppo di controllo), rilevando inoltre come l'effetto positivo si mantenga nel tempo servendosi costantemente dell'auto-prelievo, condizione ulteriormente dimostrata dalla mancanza di benefici derivante dall'uso sporadico di questa metodica(54).

Un ampio studio su oltre 14.000 donne italiane ha mostrato che l'11,9% ha risposto a un invito a sottoporsi a un Pap test in clinica e il 12,0% ha inviato un campione dopo aver ritirato un kit in farmacia, rispetto al 21,6% che ha inviato un campione dopo aver ricevuto per posta un kit di auto-prelievo (56). Questi studi hanno messo in evidenza come la percezione dell'auto-prelievo per l'identificazione dell'HPV, sia risultata simile in tutte le culture e in tutti i paesi (25) e come l'accettabilità sia elevata, in particolare delle donne più giovani.

La variazione dell'accuratezza relativa dei test HPV su campioni auto-prelevati rispetto ai test su campioni prelevati dal personale specialistico risulta minima. La sensibilità dei test HPV su auto-prelievi risulta inferiore a quella dei test HPV su un campione prelevato dal clinico (rapporto 0-88 [95% CI 0-85-0-91] per il CIN2 e 0-89 [0-83-0-96] per il CIN3). Anche la specificità risulta diminuire nei campioni di auto-prelievo rispetto ai campioni prelevati dal medico (rapporto 0-96 [0-95-0-97] per il CIN2 o peggio e 0-96 [0-93-0-0-99] per il CIN3) (57).

Tra i metodi di auto-prelievo, va considerata anche la raccolta di campioni di urina, reputata culturalmente e religiosamente più accettabile rispetto a quello vaginale (58).

In particolare, ha recentemente suscitato grande interesse, la possibilità di utilizzare l'urina del primo mitto come ulteriore campione biologico per la ricerca degli hrHPV. Recenti studi hanno indagato sulle possibilità reali di impiegare questo tipo di prelievo come fonte di materiale sul quale eseguire indagini citologiche convenzionali e ricerca di biomarker molecolari (identificazione di genotipi hrHPV, carica virale, metilazione dei geni virali e di quelli presenti nei tessuti colpiti da infezione, rilevamento di trascritti oncogeni).

Uno studio sistematico condotto in Belgio e pubblicato nel 2017(22), ha ricerca totali biomarker presenti nei campioni di urina del primo mitto per verificarne l'affidabilità diagnostica. L'assunto di partenza sul quale si sono basate le ricerche, è costituito dall'ipotesi che, sia i biomarker virali sia quelli appartenenti all'ospite, siano asportati dalla prima fuoriuscita di urina insieme alle cellule esfoliate, ai detriti ed alle impurità che si depositano spontaneamente sul perimetro del meato uretrale.

Il protocollo VALHUDES (59), un protocollo per la validazione dei dispositivi di raccolta per i test HPV su auto-prelievi e campioni di urina, ha recentemente confrontato l'accuratezza del test DNA HPV su auto-prelievi vaginali e di urine raccolti secondo protocolli standardizzati, con i test HPV eseguiti su campioni prelevati da personale specializzato. Cinquecento donne sono state invitate a prelevare un primo campione di urina e uno o più auto-prelievi vaginali con particolari dispositivi prima del prelievo di un campione cervicale da parte di un medico. I set di campioni sono stati successivamente analizzati in un laboratorio accreditato per l'analisi dell'HPV. Si è concluso che la sensibilità relativa e la specificità dei test HPV su campioni prelevati da

soli rispetto ai campioni raccolti dai medici erano del tutto simili, sia nella fase di prima chiamata che nel follow-up (59).

Pur con qualche raccomandazione, relativa alla necessità di provvedere ad approfondimenti comparativi in merito a sensibilità e specificità del test HPV eseguito su campioni raccolti in ambito sanitario rispetto a quelli provenienti da auto-prelievo, il successo e l'utilità di questa tecnica nel promuovere una maggiore partecipazione ai programmi di screening è stata riconosciuta e recepita anche dalle linee guida europee sulla prevenzione delle neoplasie cervicali (60).

1.7. Saggi molecolari e genotipizzazione dell' HPV

Numerosi sono i saggi molecolari per la ricerca e genotipizzazione dell'HPV con differenze in termini di sensibilità e specificità. I vari saggi differiscono per tipologia di metodica impiegata, per il numero di genotipi rilevati, per la possibilità di genotipizzazione, per la regione target rilevata (E1, E2, E6-E7, L1), per la presenza di controlli (controllo interno, controllo di cellularità) e non ultimo, per il grado di automazione.

Gli aspetti fondamentali per rispondere ai requisiti di Meijer e collaboratori (2009) per considerare il test molecolare "ottimale" e per garantire l'efficacia e la fattibilità nello screening primario della cervice uterina sono riassunti nei seguenti punti:

- ❖ Il test candidato non deve avere sensibilità clinica per le lesioni CIN2+ minore del 90% rispetto a quella dell'Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (HC2), per le donne di età superiore ai 30 anni.
- ❖ Il test deve avere una specificità clinica per lesioni CIN2+ non minore del 98% rispetto a quella dell'HC2, per le donne di età superiore ai 30 anni. Tale valore limiterebbe il numero dei test positivi che potrebbero inutilmente aumentare le procedure di sorveglianza con ricadute anche psicologiche per le pazienti.
- ❖ Il test deve assicurare una performance robusta e altamente affidabile, oltre che una buona riproducibilità intra e inter-laboratorio.

Attualmente i test in commercio per la rilevazione di acidi nucleici (DNA o RNA) di HPV sono essenzialmente di tre tipologie:

- ❖ Saggi per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno.
- ❖ Saggi in PCR end-point per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno e genotipizzazione virale.
- ❖ Saggi per la rilevazione degli RNA messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7(61).

1.7.1. Saggi per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno

Il test più usato a livello mondiale, che rappresenta la pietra miliare degli studi su cui sono basati i requisiti di Meijer e collaboratori (2009) per lo screening primario, è l'**HC2** (Digene Corporation, Qiagen) approvato dalla FDA nel 2003 e marchiato CE-IVD (validazione europea per la diagnostica in vitro). Tale metodo si basa sull'ibridazione in fase liquida tra il DNA di HPV presente nel campione e due cocktail di sonde a RNA, di cui uno è specifico per 13 HR-HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), l'altro è specifico per 5 LR-HPV (HPV 6, 11, 42, 43, 44). L'ibrido DNA-RNA formatosi viene catturato su piastra mediante anticorpi specifici. Un secondo anticorpo anti-ibrido, marcato con fosfatasi alcalina con rivelazione chemiluminescente, ne consente la visualizzazione, emettendo una luce con intensità (misurata in "Relative Light Units" - RLU) direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione, e fornendo, dunque, una misura semiquantitativa della carica virale. È un saggio di semplice esecuzione ed automatizzabile, che consente solo la distinzione tra HPV ad alto e a basso rischio oncogeno e non la genotipizzazione virale.

Un altro test molto usato è **Cervista HPV HR™**, (Hologic), un test diagnostico qualitativo in vitro per l'individuazione del DNA di 14 genotipi di HPV ad alto rischio, ovvero 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Il test Cervista HPV HR

utilizza la chimica Invader™, un metodo di amplificazione del segnale per l'individuazione di particolari sequenze di acidi nucleici. Questo metodo utilizza due tipi di reazioni: una prima reazione che si verifica a livello della sequenza del DNA target e una seconda reazione che produce un segnale fluorescente (62). Presenta un controllo di cellularità, che ha come target il gene dell'istone 2 umano, per ogni mix producendo un segnale semiquantitativo del DNA cellulare presente nel campione e permettendo di valutare l'idoneità del prelievo (63). La sensibilità analitica dichiarata è di 1.250-7.500 copie/reazione a seconda del genotipo.

Il test ***Cervista HPV 16/18 test™*** (Hologic): metodica basata sulla medesima tecnologia del Cervista HPV HR, ottimizzata per l'individuazione dei genotipi ad alto rischio 16 e 18 (64). La sensibilità analitica è pari a 625-1.250 copie/reazione (corrispondenti a 62,5-125 copie/μl).

Un altro test usato è ***l'Amplacor™ HPV Test*** (Amplacor, Roche), lanciato sul mercato europeo nel 2004; è un saggio qualitativo basato sulla PCR disegnato per rilevare gli stessi 13 genotipi ad alto rischio oncogeno dell'HC2 (63). I primer, utilizzati per l'amplificazione di una porzione del gene L1 dell'HPV e di una porzione del gene della β-globina umana, sono biotinilati, per permettere il legame degli eventuali amplificati con sonde oligonucleotidiche, verso HR-HPV e β-globina, immobilizzate in pozzetti di micro-piastre. Gli ibridi formati vengono rilevati con il saggio della perossidasi (65).

Il test ***RealTime High Risk HPV*** (Abbott Molecular) è un saggio basato sulla Real-Time PCR, con primer modificati GP5+/GP6+ verso il gene L1, per lo screening e la simultanea genotipizzazione degli HPV16 e 18 in singolo e come pool di genotipi di 12 HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Lanciato in Europa nel 2009 questo test usa 4 mix diverse con sonde fluorescenti specifiche per: il controllo della cellularità (β-globina), HPV16, HPV18 e per la rilevazione dei rimanenti genotipi ad alto rischio (63). Le sensibilità dichiarate sono le seguenti: HPV 16-18-35-39-45-51-59-66-68 = 500 copie/saggio; HPV 31-33-52-56 = 2000 copie/saggio; HPV 58 = 5000 copie/saggio.

Anche il test **Cobas® 4800 HPV** (Roche Molecular Diagnostic) è, come il precedente, un saggio che si basa sulla Real-Time PCR. È approvato dalla FDA e rileva simultaneamente con 4 differenti mix i genotipi degli HPV16 e 18 in singolo e come pool i genotipi: 31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-66-68, usando primer PGMY che hanno come target una porzione del gene virale L1. Ha un controllo endogeno di cellularità grazie a primer diretti verso una regione di 330 bp del gene umano β -globina. Tale test si effettua su due strumentazioni che in maniera automatizzata estraggono, purificano e preparano il DNA dal campione introdotto e settano la reazione di PCR in micro-piastre. Dopodiché l'operatore trasferisce la micro-piastra in un termociclatore per la reazione di Real-Time PCR, che potrà essere seguita per ogni mix su 4 diversi canali di rilevazione (63). La sensibilità dichiarata è: per gli HPV 33-39-51 = 0,3 copie/ μ l; HPV 16-18-31-58 = 0,6 copie/ μ l; HPV 66-68 = 1,2 copie/ μ l; HPV52 = 2,4 copie/ μ l.

Anche il kit **Anyplex™ II HPV HR Detection** (Seegene, Seoul, South Korea), viene utilizzato in ambito dello screening. È test multiplex in Real time PCR che rileva ed identifica simultaneamente 14 genotipi di HPV ad alto rischio: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68. Il saggio si basa sulla tecnologia TOCE che permette di rilevare agenti multi-patogeni in un singolo canale di fluorescenza con metodologia in PCR real-time. Un Controllo Interno (IC), un gene costitutivo (housekeeping) umano, è incorporato nel prodotto come controllo dell'intero processo endogeno per monitorare l'isolamento degli acidi nucleici e verificare l'eventuale inibizione della PCR. Il Controllo Interno è co-amplificato con gli acidi nucleici bersaglio all'interno dei campioni biologici. La sensibilità rilevata è di 50 copie/reazione per tutti gli HPV. (66)

1.7.2. Saggi PCR end-point per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno

Nell'applicazione del test HPV ad uno screening secondario, vengono impiegati test che permettono un'ampia genotipizzazione e la valutazione di infezioni multiple. La maggioranza di questi test presenti in commercio sono basati su metodica PCR end-point, con rivelazione dei genotipi attraverso tecniche diverse quali ibridazione su striscia a fase inversa (*Inno-LiPA, Linear Array*) o microarray (*Papillocheck*), permettendo la rivelazione anche di genotipi a rischio oncogeno basso ed intermedio (63).

1.7.3. Saggi per la rilevazione degli RNA messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7

Lo sviluppo di metodiche che valutano la presenza di mRNA è dovuto al fatto che, nel processo di cancerogenesi, l'over-espressione degli oncogeni virali E6 ed E7 è essenziale sia per l'inizio che per il mantenimento del fenotipo trasformato indotto dagli HR-HPV. La rilevazione dell'mRNA degli oncogeni E6/E7 potrebbe essere un marker migliore nel predire lo sviluppo di cancro rispetto alla rilevazione dell'HPV DNA (67) e permettere di distinguere le infezioni transienti da quelle persistenti (68).

Sono presenti due test in commercio basati sull'mRNA di E6/E7: il saggio *Aptima HPV* (Gen-Probe) e il *PreTect HPV-Proofer test* (Proofer, Norchip).

Il primo test (*Aptima HPV*- Gen-Probe) è un saggio qualitativo con amplificazione basata sulla sequenza di acidi nucleici (NASBA) e rileva senza genotipizzare l'mRNA di 14 HR-HPV (16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-66-68); ha un controllo interno per verificare eventuali inibizioni, ma non ha un controllo di cellularità. La tecnica NASBA si basa sull'amplificazione isotermica del bersaglio ad RNA mediante l'impiego di 3 diversi enzimi: la trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (*AMV reverse transcriptase*), la T7 RNA polimerasi e la RNasi H. Il prodotto può

essere rivelato mediante l'impiego di sonde specifiche marcate. Da alcuni lavori in letteratura emerge che la sensibilità è paragonabile a quella del test HC2, mentre la specificità è superiore (69).

L'altra metodica (*PreTect HPV-Proofer test- Proofer*, Norchip), è un saggio qualitativo basato sulla metodica NASBA che rileva l'mRNA di 5 HR-HPV (16-18-31-33-33-45) permettendone la genotipizzazione; presenta un controllo di cellularità che ha come target il gene umano U1A. Studi in letteratura evidenziano la sua maggiore specificità rispetto al test Aptima e HC2, ma mostra una sensibilità minore nella rilevazione delle lesioni CIN2+ (69).

La base dello sviluppo dei test a mRNA è convincente, con un'ottima sensibilità e maggiore specificità. Nonostante ciò, si presentano vari problemi da superare:

- la conservazione del campione (l'mRNA è molto instabile e il possibile utilizzo di tale metodica in protocolli di screening richiede sistemi di raccolta efficienti per evitarne la degradazione);
- la gestione delle donne con test mRNA negativo ma HP DNA test positivo;

1.7.4. Ruolo della carica virale come marker di progressione neoplastica

L'incapacità di un singolo HR-HPV DNA test, come dell'esame citologico, di discriminare tra le infezioni persistenti e quelle transienti ha portato alla luce la necessità di avere dei parametri identificativi che permettano di stabilire quali donne abbiano un rischio maggiore di sviluppare lesioni di alto grado (70) e anche di ridurre il numero delle pazienti che sono soggette a follow-up non necessari dovuti a infezioni transienti (71). La carica virale è stata proposta come possibile candidato per ovviare sia a queste problematiche, con importanti risvolti clinici ed economici, sia per discriminare le infezioni virali da trattare da quelle non clinicamente rilevanti. Le metodologie utilizzate per quantificare la carica virale hanno diversi livelli di specificità e sensibilità e la valutazione della performance della metodica spesso non è comprensibile (72). Il

sistema semi-quantitativo HC2 è uno tra i più usati per determinare la carica virale dell'HPV (73; 72) sebbene non abbia la capacità di differenziare i vari genotipi; si usano anche metodiche basate sulla PCR che utilizzano un'analisi densitometrica per determinare la carica e associarla ai vari gradi di lesione (74). Tuttavia, la metodica prevalentemente usata è la Real Time PCR quantitativa, in quanto ha il vantaggio di essere altamente specifica, riproducibile e in grado di rilevare la carica dell'HPV con un ampio range di ordini di grandezza (75), sia con sonde Taqman (71; 74) che con Sybr Green (70; 76).

Tuttora il ruolo della misurazione della carica virale in programmi di screening o nel management di pazienti con anomalie citologiche rimane non chiara (77), nonostante i numerosi studi a riguardo, in parte anche dovuta alla non uniformità nell'espressione dei risultati. Alcuni di questi affermano come la carica virale aumenti in maniera statisticamente significativa tra chi ha lesioni e chi no (78; 79), non prendendo in considerazione i vari gradi di lesione. Altri studi invece in maniera più specifica dichiarano che la carica aumenta in maniera statisticamente significativa all'aumentare della lesione citologica (74;80; 81), non associandola però all'eventuale lesione istologica. Altri invece si concentrano solo sulle lesioni istologiche, affermando che la carica è più alta in maniera significativa solo nei carcinomi (82); oppure che la carica discrimina le lesioni CIN2+ (72). Secondo lo studio di *Saunier e collaboratori (2008)* la carica correla in maniera statisticamente significativa con la lesione citologica ma non con la lesione istologica (80), mentre secondo *Tsai e collaboratori (2005)* la carica correla con la lesione istologica fino al grado CIN2 per poi diminuire nei CIN3 (83). Altri studi spesso prendono in considerazione genotipi raggruppati (71; 72), altri invece non normalizzano la carica virale per la cellularità del campione (73; 72; 79; 83).

La normalizzazione della carica con un gene umano, per standardizzare le variazioni dovute alla cellularità del campione, è importante per un'accurata interpretazione dell'associazione tra carica e lesione (76), permettendo di calcolare la vera carica virale su cellula ed eliminando le fluttuazioni dovute alle variazioni nel numero di cellule tra campioni diversi e tra intervalli di tempo diversi per campioni dello stesso paziente (84). Molto spesso negli studi in cui la carica virale viene normalizzata per la cellularità del campione, uno standard a concentrazione nota è usato a diluizioni scalari per costruire una retta di taratura sulla quale calcolare la cellularità (70; 76), ma questo può portare ad errori come l'inaccurata misurazione della concentrazione di DNA, errori di

manualità e pipettamento nell'allestire differenti curve di calibrazione. Secondo *Roberts e collaboratori (2008)* piccoli errori nella quantificazione o nel dispensare il DNA si possono tradurre in ampie over-under estimazioni della carica virale. In relazione a ciò, nello studio in questione, per la quantificazione viene usato un plasmide contenente i geni virali E2 ed E6 e il gene umano Hydroxy Methyl Bilane Synthase (HMBS) in rapporto 1:1:1 per un'unica curva di calibrazione dei tre geni, riducendo errori di manualità (85).

Alcuni degli studi in cui non vi è normalizzazione della carica virale per la cellularità del campione, si riscontra una correlazione statisticamente significativa tra la carica e il grado di lesione (72; 79; 83; 86); altri evidenziano come la carica virale assoluta correli con la lesione, ma una volta che la carica viene normalizzata la significatività statistica della correlazione viene persa (76; 77). L'osservazione di una carica virale assoluta che aumenta all'aumentare della lesione può essere spiegata dal fatto che le cellule anormali esprimono meno molecole di adesione cellulare, rispetto alle cellule normali, e vengono per questo maggiormente esfoliate (76; 84; 87). Nello studio di *Swan e collaboratori (1999)* si evidenzia come la quantità di DNA cellulare vari ampiamente tra i vari campioni citologici, con un aumento statisticamente significativo delle cellule all'aumentare del grado di lesione (88).

Nonostante la normalizzazione della carica virale per la cellularità del campione sia uno step fondamentale per avere dei dati più accurati sul valore clinico della carica, non è possibile distinguere le cellule infettate da quelle non infettate in un campione cervicale. È inevitabile che ogni campione abbia una quota di cellule infette e una quota di cellule non infette e irrilevanti dal punto di vista clinico (76). Alcuni lavori evidenziano la correlazione tra carica virale e lesione in base al genotipo di HPV infettante: pare infatti, ad esempio, che la carica virale nell'infezione da HPV18 non sia correlata alla lesione, mentre per tale genotipo sembra più importante l'evento di integrazione per l'evolversi verso lesioni di alto grado (87). Nello studio di *Ramanakumar e collaboratori (2010)* si sottolinea come alte cariche di HPV16 e 18 correlino con la persistenza della lesione, mentre per i genotipi 31 e 45 tale correlazione non è statisticamente significativa (89). Secondo lo studio di *Constandinou-Williams e collaboratori (2010)* la carica virale non risulta essere un buon marker in quanto tende ad aumentare e diminuire nel corso dell'infezione, perciò è impossibile con una sola misurazione voler predire l'evoluzione della patologia, infatti ad una iniziale alta carica può seguire una bassa carica e

viceversa. Sebbene in questo studio si scelga la più alta carica tra misurazioni successive (follow-up a sei mesi) anch'essa non distingue coloro che sviluppano lesioni o meno (87). Inoltre, il sostanziale overlap di cariche tra coloro che sviluppano lesioni e coloro che non le sviluppano evidenzia i motivi per i quali ancora, non esista un cut-off clinicamente utile per la carica (70; 87).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni si è assistito a profondi cambiamenti ed innovazioni nella prevenzione del carcinoma della cervice attraverso l'integrazione della prevenzione primaria (vaccinazione contro l'HPV) con la prevenzione secondaria: screening con Pap test o, più recentemente, mediante l'introduzione di nuove modalità di screening con l'HPV test.

In particolare, il nostro Paese, uno tra i primi in Europa, ha deciso di innovare questo programma di prevenzione secondaria dando indicazione ai decisori regionali di passare all'HPV test come test primario nello screening cervicale (43).

Il Piano Nazionale della Prevenzione (PNP) 2014-2018 ha chiesto alle Regioni di implementare lo screening cervicale con HPV primario, in sostituzione al Pap test, entro il 2019. L'implementazione prevede l'applicazione del protocollo descritto nel documento di indirizzo del Ministero della Salute del 2013, dove è specificato che per lo screening HPV devono essere utilizzati test a DNA validati secondo quanto riportato nel documento HTA (Health Technology Assessment) HPV del 2012. Tale elenco è stato successivamente aggiornato nel corso degli anni (con cadenza annuale) con l'inserimento di ulteriori test molecolari validati attraverso studi secondo la metodologia proposta da Meijer e collaboratori.

Il documento è il risultato della revisione sistematica della letteratura sui test HPV validati per lo screening, fatta sulla base delle raccomandazioni di Meijer et al, 2009, che prevedono i seguenti componenti PICOS:

- P (population): donne aderenti a programmi di screening cervicale, di età 30-64 anni
- I (intervention): utilizzo di test hrHPV diverso da HC2 (Qiagen) e da GP5+/6+ PCR-EIA
- C (comparator): HC2 (Qiagen) o GP5+/6+ PCR-EIA
- O (outcome): sensibilità (Qiagen) o GP5+/6+ PCR-EIA o da HC2 (Qiagen) e da GP5+/6+ PCR-EIA validi
- S (study): studi di validazione condotti secondo i criteri di Meijer et al, 2009 (44).

Inoltre, sistemi di auto-prelievo, sia per la raccolta di campioni vaginali che di urine, sono stati recentemente proposti per migliorare l'adesione della popolazione ai programmi di screening, che risulta essere particolarmente bassa in alcune aree geografiche come, ad esempio, la Regione Sardegna. I principali ostacoli all'adesione

allo screening riguardano: precedenti esperienze negative dell'utente (disagio o dolore durante una visita specialistica); sentimenti di imbarazzo e vergogna. Esperienze negative passate che possono scoraggiare le donne dal recarsi di nuovo da un operatore sanitario(48).

Allo stesso tempo, la scarsa specificità clinica, dovuta all'elevata frequenza di infezioni transienti, rende necessario lo sviluppo di nuovi biomarker virali in grado di discriminare le donne a più alto rischio di sviluppare tumore.

Questi cambiamenti, che stanno avvenendo gradualmente, rappresentano una sfida nuova ed importante per il Servizio Sanitario italiano impegnato sempre più in una fondamentale iniziativa di prevenzione per la salute pubblica, gratuita, diffusa e disponibile per tutti.

Sulla base di tali premesse, i diversi obiettivi della presente tesi di Dottorato sono:

- la validazione clinica di nuovi biomarker virali, indicatori di infezione persistente sostenuta da HPV oncogeni (hrHPV) al fine di sviluppare sistemi diagnostici innovativi.
- identificare nuove modalità diagnostiche innovative, nel migliorare i programmi di screening per la prevenzione del carcinoma cervicale, al fine di favorire di conseguenza l'adesione allo screening.
- messa a punto e la validazione clinica di saggi molecolari per la ricerca del DNA dei principali hrHPVs, per la quantificazione genotipo specifico (HPV viral load).

Indirettamente, il raggiungimento di tali obiettivi consentirà di rilevare e tipizzare i principali genotipi oncogeni, permetterà anche di acquisire dati epidemiologici per definire la prevalenza dei genotipi circolanti nella Regione Sardegna in seguito all'introduzione del vaccino contro HPV.

Nello specifico, la presente tesi è stata suddivisa in due sezioni:

- La prima parte della tesi, che ho condotto nel periodo di stage presso la Ditta COPAN di Brescia, partner scientifico nazionale del progetto di Dottorato, ha focalizzato l'attenzione sulla valutazione dell'accettabilità e accuratezza dell'HPV Test eseguito con differenti sistemi di auto-prelievo vaginale rispetto all'HPV Test eseguito su campione cervicale (gold standard);
- La seconda parte, svolta presso gli stabilimenti degli altri due partner progettuali, GeneFirst (Abingdon, Oxford, UK) e Hiantis (Brescia, Italia), ha invece riguardato lo sviluppo di nuovi dispositivi diagnostici per l'analisi e l'identificazione quali-quantitativa dei principali HR-HPVs. In particolare, nel corso del triennio formativo, ho

contribuito a sviluppare e testare su campioni biologici il prototipo del kit “OncoPredict”, sviluppato dalla Ditta Hiantis.

I prototipi dei nuovi kit sviluppati sono stati utilizzati su campioni di auto-prelievo vaginale e del primo mitto di urina, in comparazione con i campioni cervicali prelevati dal clinico (Gold Standard) allo scopo di una loro validazione clinica su scala internazionale (VALGENT&VALHUDES).

Per lo scopo, oltre alla già citata Ditta COPAN (Brescia, Italia), azienda italiana specializzata nella produzione di sistemi di prelievo e trasporto dei campioni per l’analisi microbiologica, si è collaborato con le aziende RoversMedical (Paesi Bassi) e EveMedical (Canada) e Novosanis (Belgio), specializzate nella produzione e sviluppo di dispositivi diagnostici finalizzati per lo screening del cervico carcinoma.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione in studio

Lo studio, eziopatogenetico a carattere epidemiologico prospettico di coorte, approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca (prot. 305, numero protocollo 0037320/17), ha previsto l'arruolamento di una coorte di donne con documentata displasia cervicale (LSIL, ASCUS, AGC, ASCH o HSIL) riferite per esame colposcopico, presso gli ambulatori di Ginecologia dell'Ospedale San Gerardo di Monza, secondo i criteri di inclusione ed esclusione di seguito riportati.

Criteri di inclusione:

- ❖ documentata diagnosi citologica di LSIL, ASCUS, AGC, ASCH o HSIL

Criteri di esclusione:

- ❖ immunosoppressione o presenza di un'infezione da HIV
- ❖ stato di gravidanza, presunta o accertata
- ❖ presenza di patologie del sistema immunitario e autoimmunitarie
- ❖ diagnosi di patologia tumorale maligna, terapia chemioterapica in corso o terminata nei 6 mesi precedenti l'ingresso nello studio.

3.2. *Devices* impiegati e questionari di gradimento

Le pazienti reclutate sono state istruite per la corretta modalità di raccolta dei campioni biologici con l'utilizzo dei dispositivi di auto-prelievo (Figure 11-15):

- ❖ tampone vaginale **FLOQSwabs**[®] (Copan)
- ❖ tampone vaginale **Evalyn®Brush** (RoversMedical)
- ❖ tampone vaginale **HerSwab**[™] (EveMedical)
- ❖ *device* per la raccolta delle urine **Colli-Pee**[™] (Novosanis).

Presso gli ambulatori della Clinica Ginecologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza, prima della visita colposcopia, affinché le sostanze impiegate per l'analisi in colposcopia, non vadano ad interferire con il risultato dei vari prelievi, sia cervicale che

vaginale, il ginecologo esegue il prelievo di un campione citologico cervicale con il tampone **L-Shaped Endocervical/Esocervical FloqSwab®**, Copan. Il *device* cervicale, come mostrato in figura 11, è un tampone cotonato a forma di L per agevolare il prelievo cervicale, prelevato dallo specialista, viene immerso in una Falcon contenente 20 mL di ThinPrep o PreservCytSolution (HOLOGIC) e successivamente inviato al laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

Fig.11. Tampone cervicale utilizzato dal clinico L-Shaped Endocervical/EsocervicalFloqSwab® (Copan)



Per la stessa motivazione, appena descritta, ancor prima del prelievo cervicale, sempre in sede ambulatoriale, sono stati eseguiti gli auto-prelievi vaginali e di urina.

Personale specializzato ha fornito alle pazienti i dispositivi di auto-prelievo, fornendo loro le indicazioni dettagliate e le modalità di utilizzo e i questionari di gradimento. La prima parte della presente tesi ha previsto l'arruolamento di 40 donne, suddivise in due gruppi:

- Le componenti del primo gruppo (20 pazienti) hanno utilizzato i tamponi **FLOQSwabs®** e **HerSwab™**. Di queste, le prime 10, hanno impiegato, *in primis* il dispositivo **FLOQSwabs®** e successivamente il tampone **HerSwab™**. Le seconde 20 hanno utilizzato prima il tampone **HerSwab™** e in seguito **FLOQSwabs®**.


- Le partecipanti del secondo gruppo (20 pazienti) hanno invece utilizzato i tamponi **FLOQSwabs®** e **Evalyn®Brush**. Le prime 10 pazienti hanno eseguito il prelievo, *in primis*, con il dispositivo **FLOQSwabs®** e successivamente con l'**Evalyn®Brush**. Le ulteriori 10 pazienti hanno utilizzato prima il tampone **Evalyn®Brush** e in seguito il **FLOQSwabs®**.

Di seguito sono riportate le istruzioni fornite alle pazienti e spiegate accuratamente da personale addestrato.

I tre rispettivi tamponi di auto-prelievo, hanno delle caratteristiche differenti e distintive. Il tampone **FLOQSwabs®**, mostrato in figura 12, è un tampone di semplice struttura, costituito da un'asta di plastica con all'apice la porzione cotonata.

Fig.12. Istruzioni per auto-prelievo vaginale con tampone FLOQSwabs® (Copan)

FLOQSwabs™ per autoprelievo vaginale



FLOQSwabs™ in tubo

ISTRUZIONI per come effettuare il prelievo vaginale

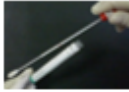
Fig. 1  1. Tenere il tampone dal tappo rosa, estrarre il tampone dal tubo e appoggiare il tubo su una superficie pulita. (fig.1).


Fig. 2  2. Tenere il tampone dal mezzo dell'asta o dal punto rosso marcato sull'asta.




Fig. 3  3. Mettetevi nella posizione che preferite.:
- In piedi con le gambe aperte (fig. 3)
- Sedute sulla toilette con le gambe aperte (fig. 4)

Fig. 4  4. Usare la mano libera per stirare all'esterno la pelle che copre l'apertura della vagina.

5. Inserire il tampone nell'apertura della vagina fino a quando le dita toccano la vulva, rotare il tampone 4 volte, quindi estrarre il tampone.

Fig. 5  6. Inserire il tampone nel tubo di plastica e chiudere bene. (fig.5)

Il tampone di auto-prelievo **HerSwab™** (figura 13), è strutturalmente differente dal precedente *device*, costituito, all'apice da un apposito spazzolino integrato a tutta la struttura, alla base è presente una rotella in plastica che permette la rotazione di 360° del tampone durante il prelievo.

In ultimo, il tampone di auto-prelievo *Evalyn®Brush* (figura 14), è simile all'antecedente *device*, è provvisto, di uno spazzolino con setole fine che assicurano il prelievo di materiale cellulare in quantità sufficiente e di uno stantuffo necessario per effettuare le rotazioni al momento del prelievo.

Tutti i tamponi di auto-prelievo, sono stati inviati a secco presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

Fig.13. Istruzioni per auto-prelievo vaginale con tampone HerSwab™ (EveMedical)

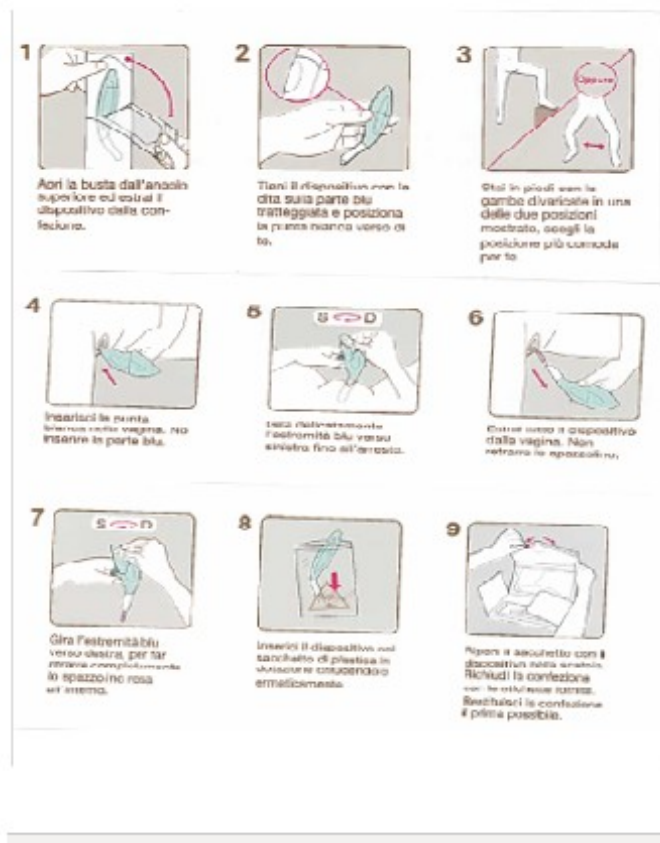
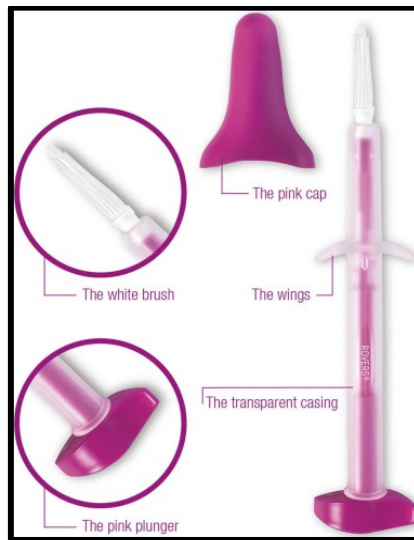


Fig. 14. Istruzioni per auto-prelievo vaginale con tampone Evalyn®Brush (RoversMedical)



evalyn®brush **Semplice, sicuro ed affidabile** Queste istruzioni illustrano l'utilizzo dell'Evalyn®Brush.

Evalyn®Brush
Evalyn®Brush è un dispositivo sterile che consente di sottoporsi a test a casa propria. Evalyn®Brush consente di prelevare materiale cellulare dalla vagina con la massima facilità ed in modo indolore. Il materiale cellulare prelevato viene successivamente analizzato in un laboratorio professionale.

Note importanti

- Non utilizzare il prodotto qualora la confezione dell'Evalyn®Brush fosse danneggiata oppure in caso di superamento della data di scadenza.
- Non utilizzare il prodotto durante il ciclo mestruale.
- Non utilizzare il prodotto durante una gravidanza o nei tre mesi immediatamente successivi ad una gravidanza.
- Non utilizzare altri prodotti vaginali per almeno due giorni prima di utilizzare l'Evalyn®Brush. Contraccettivi vaginali, preservativi e prodotti lubrificanti a base acquosa possono essere utilizzati normalmente.
- Prodotto esclusivamente monouso.
- Un eventuale utilizzo del prodotto può causare infezioni e/o determinare una diagnosi errata.

1. Lavarsi le mani prima di utilizzare il prodotto.
2. Estrarre l'Evalyn®Brush dalla confezione. Non gettare la confezione poiché servirà a spedire l'Evalyn®Brush al laboratorio dopo l'uso.
3. Premere i bottoni del coperchietto rosa con il pollice e l'indice per rimuovere dall'Evalyn®Brush. Evitare tassativamente di toccare con le mani le fibre bianche dell'Evalyn®Brush.
4. Prelevare il campione in posizione eretta. Assicurare una posizione comoda del corpo, come se si dovesse inserire un tampone interno.
5. Disinfettare la labbra con una rasoia inserendo con l'altra l'Evalyn®Brush in vagina finché le ali non vengono a contatto con le labbra.
6. Tenere l'involucro trasparente con una mano premendo con l'altra lo stantuffo rosa in direzione dell'involo trasparente. Usando lo spruzzo di linea in movimento con la stantuffo rosa a diretto contatto con l'involucro, si avvertirà una scatta.
7. Effettuare otto cinque rotazioni con lo stantuffo rosa nella stessa direzione. Dopo ogni rotazione, si avvertirà uno scatto. Ciò allo scopo di evitare a breve il resto delle rotazioni effettuate. Dopo aver ruotato lo stantuffo cinque volte, estrarre delicatamente l'Evalyn®Brush.
8. Tenere l'allungamento trasparente con una mano tirando con l'altra lo stantuffo rosa finché lo spazio bianco non sporga nell'involo. Nell'effettuare questa operazione, evitare di toccare la parte superiore sopra le ali.

La seconda parte del lavoro ha interessato il reclutamento di 100 donne (presso la Clinica Ginecologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza), sottoposte a prelievo cervicale, **L-Shaped Endocervical/Esocervical FloqSwab®**, effettuato dal clinico, auto-prelievo vaginale con l'utilizzo del tampone **FLOQSwabs®** (come descritto precedentemente), e auto-prelievo dell'urina, con il **device Colli-Pee™** (figura 15). Questo è un sistema innovativo di raccolta del primo mitto di urina, crea un passaggio

attraverso il quale l'urina superflua può passare direttamente nella toilette, senza interrompere il suo flusso, in maniera facile ed efficiente.

Data la possibilità di proliferazione microbica nelle urine, nella sede di prelievo e trasporto dei campioni, sono necessari metodi per stabilizzare i campioni stessi, a tale proposito il dispositivo innovativo **Colli-Pee™**, contiene un liquido conservante, per la stabilizzazione dell'urina per consentire una migliore conservazione e trasporto del materiale biologico a temperatura ambiente.

Fig.15. Istruzioni per auto-prelievo di urina da primo mitto con dispositivo Colli-Pee™ (Novosanis)



**Questionario di valutazione per il tampone:
Regular FLOQSwabs®, Evalyn®Brush, HerSwab™, Self-collection:**

| | | | |
|---|--------|---|----------------------------|
| Nome: _____ | | Data di nascita: ____/____/____ Giorno Mese Anno | |
| Grado di educazione (Segnare con una croce) | | Elementare__ | Media__ |
| | | Superiore__ | Universitaria__ |
| 1. Estrarre il tampone dal tubo è stato _____ | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Molto facile | Facile | Difficile | Molto Difficile |
| 2. Inserire il tampone nella vagina è stato _____ | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Molto facile | Facile | Difficile | Molto Difficile |
| 3. Tenere in mano il tampone e ruotarlo è stato _____ | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Molto facile | Facile | Difficile | Molto Difficile |
| 4. Il tampone ha causato dolore durante il prelievo? | | | |
| | | Si | No |
| 5. Il tampone ha causato perdita di sangue durante il prelievo? | | | |
| | | Si | No |
| 6. Reinscrivere il tampone nel tubo e chiuderlo è stato _____ | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Molto facile | Facile | Difficile | Molto Difficile |
| Informazioni generali | | | |
| Le istruzioni fornite per l'auto-prelievo sono chiare e facili da capire? | | | Si o No (Cerchia) |
| Inserire suggerimenti _____ | | | |
| La procedura di auto-prelievo, tutto considerato è stata facile? | | | Si o No (Cerchia) |
| Inserire commenti _____ | | | |
| Preferireste fare l'auto-prelievo vaginale a casa (rispetto al campionamento effettuato in ambulatorio dal personale medico)? | | | Si o No (Cerchia) |
| Inserire commenti: _____ | | | |

3.3. Processamento dei campioni biologici

I campioni biologici sono stati processati rispettando i seguenti protocolli:

1. *Protocollo tamponi vaginali (auto-prelievi):* dall'ambulatorio del Reparto di ginecologia dell' Ospedale San Gerardo di Monza, in cui è stato effettuato il prelievo, i diversi tamponi di auto-prelievo sono stati inviati a secco, presso il laboratorio di Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca. I tamponi sono stati stemperati in 5,5 mL di Thin-Prep (Hologic), ali quotati in CRIOVIALS da 1,1 mL e conservati a -20°C.

2. *Protocollo tamponi cervicali:* i tamponi sono stati trasportati all'interno di Falcon nella quali era stato aggiunto 20 mL di Thin-Prep (Hologic); una volta pervenuti in laboratorio, sono stati vortexati per 1 minuto alla massima velocità e aliquotati in CRIOVIALS da 1,5 mL conservati a -20°C.

3. *Protocollo urine:* per la raccolta del primo mitto di urine (14-16 mL di urina) è stato utilizzato il dispositivo Colli-Pee (Novosanis) contenente 4 mL di conservante; i campioni, una volta pervenuti in laboratorio sono stati ali quotati in CRIOVIALS da 1,5 mL e conservati a -20°C.

3.4. Estrazione acidi nucleici da campioni biologici

L'apparecchio automatico di estrazione NucliSENS[®] easyMAG[®], realizzato dalla Biomerieux (Figura 16), è il dispositivo impiegato per l'estrazione degli acidi nucleici dai suddetti campioni biologici.

Fig. 16. Estrattore automatico NucliSENS[®] easyMAG[®] prodotto dalla bioMérieux.



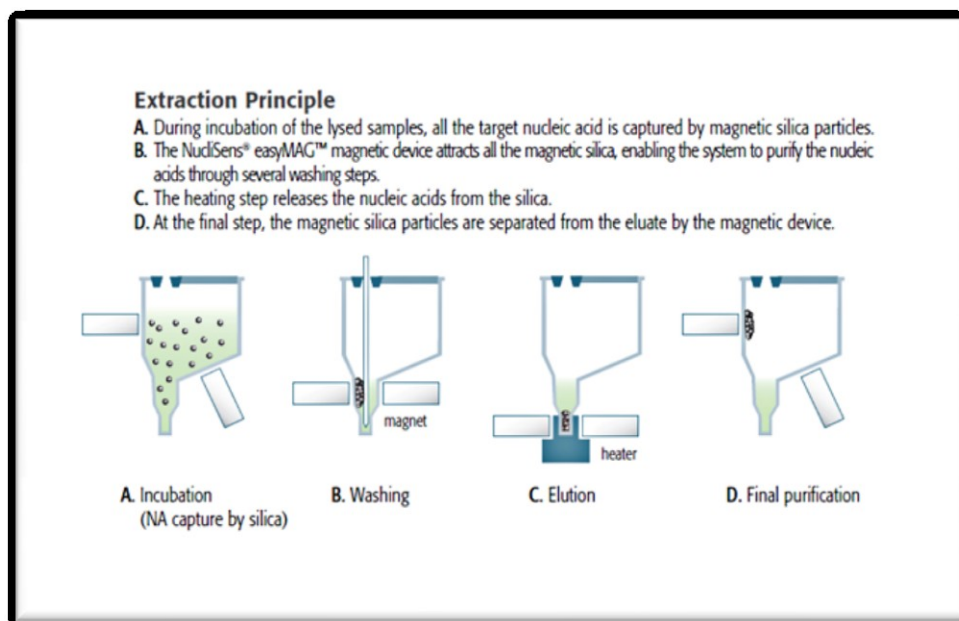
NucliSENS[®] easyMAG[®] è un sistema automatizzato che utilizza la tecnologia BOOM[®], un metodo innovativo messo a punto dalla bioMérieux per l'estrazione in fase solida di acidi nucleici mediante l'impiego di silice. Il principio sul quale è concepita questa metodologia utilizza l'interazione elettrostatica per legare e trattenere le molecole di DNA ed RNA, cariche negativamente, sulla superficie di biglie di silice dotate di carica positiva.

Principio dell'estrazione:

- ❖ L'acido nucleico target aderisce alle particelle di silice magnetica durante la fase d'incubazione dei campioni lisati.
- ❖ NucliSENS[®] easyMAG[®] attrae la silice magnetizzata mediante apposito dispositivo magnetico, purificando gli acidi nucleici catturati durante l'incubazione attraverso cicli di lavaggio in serie.
- ❖ Il rilascio degli acidi nuclei dalla silice avviene mediante riscaldamento
- ❖ Al termine della procedura, le particelle di silice magnetica sono separate dall'eluato mediante dispositivo magnetico (Figura 17).

Il touchscreen presente sull'apparecchiatura consente un'agevole gestione del campione, dei reattivi e dei consumabili. Il software di sistema consente una gestione sistematica dei dati guidata dall'interfaccia touchscreen.

Fig.17.Principio di funzionamento dell'estrattore automatico NucliSenseeasyMAG, della dittaBioMérieux.



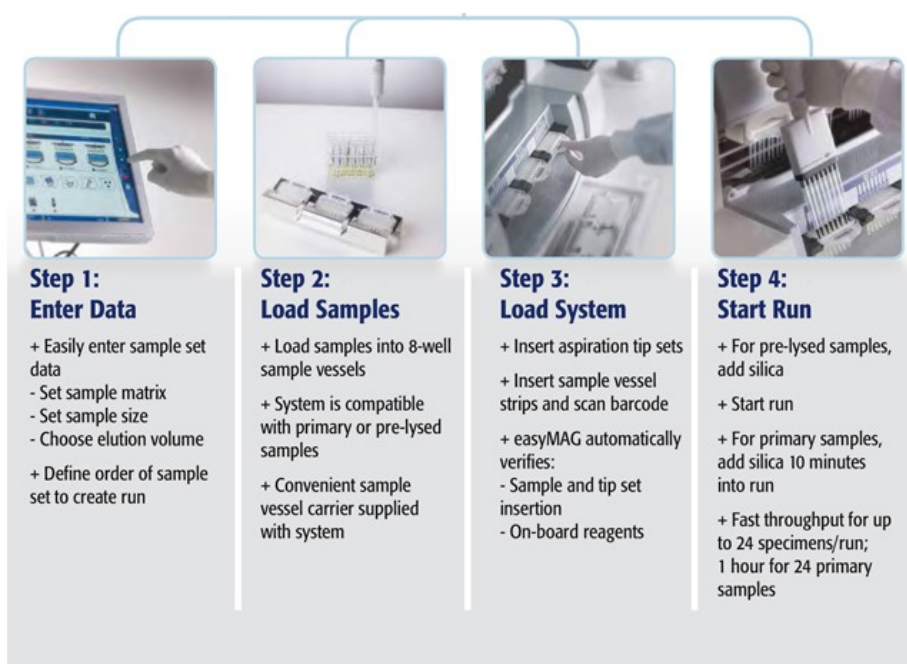
Il processo di estrazione parte con l'inserimento dei dati dei campioni nel software dello strumento, indicando la matrice, la quantità di partenza, il volume di eluizione desiderato e il protocollo. I protocolli operativi disponibili sono due: generico e specifico, che richiedono rispettivamente 30-40 minuti e 50-60 minuti (in base al numero dei campioni). Il secondo protocollo esegue più lavaggi rispetto al primo e ha una temperatura più elevata per la separazione degli acidi nucleici dalle biglie magnetiche.

Successivamente, si procede caricando il materiale biologico negli appositi supporti ad otto camere, ciascuna identificabile mediante codice a barre. Lo strumento consente l'estrazione sia da campioni pre-lisati sia da campioni primari. I campioni primari devono essere preventivamente incubati in un buffer di lisi per 10 minuti. A questo punto è possibile aggiungere la silice magnetizzata (125 µl) ed avviare la procedura (Figura 18).

Il volume di eluizione selezionato è di 100 µl per tamponi vaginali e cervicali e 40 µl per le urine.

La quantità di DNA estratto è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro (Nanodrop). Tutti gli estratti avevano una quantità di DNA ottimale e una purezza che rientrava nei parametri (1,6- 1,8).

Fig. 18. Fasi del processo di estrazione con NucliSENSeasyMAG



3.5 Identificazione e quantificazione del DNA virale con OncoPredict DNA KIT e genotipizzazione con Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene) in Real Time PCR.

Tutti i campioni biologici raccolti sono stati analizzati in parallelo con il kit CE-IVD Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene) e con il saggio sperimentale OncoPredict DNA KIT.

Anyplex™ II HPV28 Detection è un saggio Real-Time PCR che ha come target la regione L1 del genoma virale e consente di individuare la presenza di Papilloma virus umani all'interno di campioni biologici. Il kit è basato sulle tecnologie Seegene Dual Priming Oligonucleotide (DPO™) e Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension (TOCE™) che riescono ad assicurare rispettivamente un'alta sensibilità e specificità di reazione (DPO™) e la rilevazione di più target nello stesso canale di fluorescenza all'interno di un unico tubo di reazione permettendo, in questo modo, il dosaggio semiquantitativo degli analiti mediante l'analisi delle temperature di melting (TOCE™). Il kit consiste in due differenti reazioni di Real-Time PCR (set A e set B). Entrambe le reazioni utilizzano un gene costitutivo (housekeeping) umano come IC endogeno, in

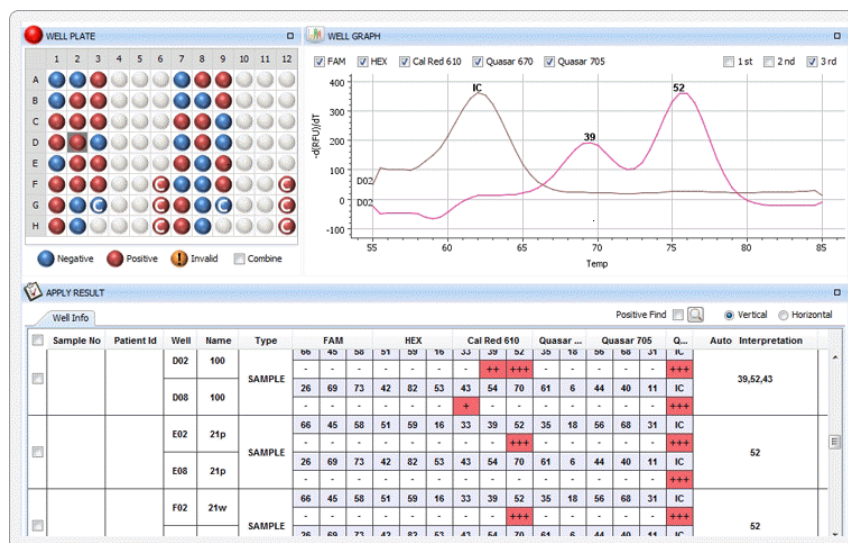
grado di garantire la purificazione del DNA, la verifica della reazione di PCR e il chiarimento dell'adeguatezza delle cellule derivanti da ogni campione biologico.

- Il set A è un saggio multiplex che permette l'amplificazione e genotipizzazione simultanea di DNA bersaglio di 14 genotipi di Papilloma virus umani ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) e di un controllo interno.
- Il set B è un saggio multiplex che permette l'amplificazione e genotipizzazione simultanea di DNA bersaglio di 14 genotipi di Papilloma virus umani a basso rischio oncogeno (6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 69, 70, 73, 82) e di un controllo interno. Il limite di rivelabilità per la sensibilità è di 50 copie/reazione.

Per la rilevazione vengono usati 5 fluorocromi differenti: FAM, HEX, Cal Red 610 e 670 e Quasar 705.

Il risultato finale deriva dall'elaborazione, mediante uno specifico software che oltre a verificare che tutta la procedura analitica sia stata rispettata converte il segnale di fluorescenza rilevato nei singoli campioni in positività o negatività per la presenza degli specifici genotipi. Il sistema attribuisce un risultato semi-quantitativo all'analisi attribuendo a ciascun campione da un minimo di un + ad un massimo di tre +, a seconda dell'intensità del segnale rilevato, espressione indiretta di maggiore o minore carica virale (Figura 19).

Fig. 19. Schermata risultato analisi del software mediante Real-Time PCR



Il prototipo del *kit HPV-OncoPredict* è un test *in vitro* rapido, sensibile, specifico e riproducibile in Real-Time PCR per l'identificazione quantitativa del DNA dei Papillomavirus umani (HPV) dei seguenti 13 genotipi di ad alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68a/b.

L'utilizzo del prototipo del kit è stato studiato su tutti i campioni biologici precedentemente descritti (tamponi cervicali prelevati dal clinico, campioni di auto-prelievo vaginale e di urina).

La valutazione quantitativa dei 13 genotipi di HPV è stata determinata usando sei moduli di OncoPredict kit (**QC, SCR, QT1-QT2-QT3-QT4**) racchiusi in due linee di test:

❖ **LINEA1-MODULO QC (CONTROLLO DI QUALITÀ) + MODULO SCR (SCREENING HPV).**

Consente di verificare la conformità diagnostica del campione, **MODULO QC**(efficienza di estrazione, efficienza di amplificazione ed adeguatezza del campione in termini di numero di copie hGE, Genoma Umano Equivalente) e valutare la presenza di uno o più dei 13 genotipi HPV ad alto rischio, HPV-16, HPV-18 e gli 11 HPV_s identificati contemporaneamente (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 and 68a/b) attraverso il **MODULO SCR**.

❖ **LINEA 2- MODULO QT (TIPIZZAZIONE QUANTITATIVA)QT-1, QT-2, QT-3, QT4.**

In questa linea di test, i campioni risultati positivi alla precedente analisi di screening vengono analizzati utilizzando ulteriori quattro moduli indipendenti:

- **MODULO QT-1:** per l'identificazione dell'HPV-16,18,45;
- **MODULO QT-2:** per l'identificazione dell'HPV-33,31,52;
- **MODULO QT-3:** per l'identificazione dell'HPV-58,35,59;
- **MODULO QT-4:** per l'identificazione dell'HPV 51,39,56;

che permettono l'identificazione ed il calcolo della carica virale HPV genotipo-specifica di uno o più dei 13 genotipi, normalizzata ed espressa in:

- Unità Internazionali (UI) / 10.000 cellule e Copie delle Unità Internazionali / DNA genomico umano per i campioni cervicali e gli auto-prelievi vaginali e, in alternativa
- Unità Internazionali (UI) /mL, per i campioni prelevati del primo mitto di urina (quantità di copie di copie di DNA genomico umano rilevate nell'urina non è direttamente correlata al numero di cellule, a causa della presenza nel campione biologico liquido del DNA frammentato derivato dal sangue e dal distretto urogenitale).

HPV-OncoPredict include, inoltre, un kit (**KIT DI SETTING**), contenente i reagenti appartenenti a tutti e sei i moduli HPV-OncoPredict, funzionali alla valutazione delle prestazioni di OncoPredict su ogni strumento di Real-Time PCR specifico e permettendo di raggiungere la robustezza richiesta durante la routine diagnostica.

Il KIT di SETTING, permette di ottenere le curve di calibrazione necessarie per l'identificazione e l'utilizzo dei segnali in FAM, HEX, ROX, CY5, nei successi MODULI (QC,SCR, QT1-4).

La specifica robustezza del kit prototipo è stata determinata utilizzando dei calibratori tecnici per consentire la valutazione e la correzione delle imprecisioni analitiche. I calibratori usati appartengono principalmente a due categorie:

❖ Calibratori richiesti per valutare la qualità della procedura analitica, (*Campione per campione*):

- a) *CALIBRATORE ESOGENO*. Un DNA standard titolato è aggiunto al campione prima dell'estrazione. Dalla sua amplificazione, è previsto uno specifico valore di Ct.
- b) *hGE (Genoma Umano Equivalente)*, determinazione del numero delle copie. Un gene umano autosomico (CCR5) è aggiunto alla reazione di PCR per calcolare il numero dei genomi umani equivalenti di ciascun campione.
- c) *CALIBRATORE DI AMPLIFICAZIONE*. Un DNA standard titolato è presente nella mix di reazione. È previsto uno specifico valore di Ct dalla sua amplificazione.

❖ Calibratori inclusi nel kit prototipo, affinché la reazione di PCR abbia esito positivo, (*Sessione per sessione*):

- a) *Controllo Positivo* DNA standard dei 13 HPV. È previsto uno specifico valore di Ct per ciascun parametro.
- b) *Calibratore 1-4* (quattro provette con una concentrazione scalare dei 13 HPV e del hGE, con una concentrazione costante del CALIBRATORE ESOGENO e del CALIBRATORE DI AMPLIFICAZIONE).
- c) *Controllo negativo*. Acqua priva di RNasi. Non è previsto nessun valore di Ct.

Tabella 4. HPV-OncoPredict kit e le sue relative funzioni

| CONFEZIONE DEL KIT | DESCRIZIONE | APPLICAZIONE |
|---------------------------|--|---|
| KIT SETTING | REAGENTI DEL SET (MODULI QC, SCR, QT1-4) | NORMALIZZAZIONE QUANTICA PER I CANALI FAM-HEX- ROX-CY5 SU PIÙ TIPI DI STRUMENTI |
| MODULO QC-SCR | VALUTAZIONE DEL CAMPIONE E DEL PROCESSO DEL TEST DI SCREENING HPV (QUALITATIVO) PER: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 E 68 a/b | TEST DI LINEA 1 SCREENING HPV |
| MODULO QT 1-4 | DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE GENOTIPO-SPECIFICA PER I 12 HPV: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59. HPV68 NON INCLUSO | TEST LINEA 2 TIPIZZAZIONE QUANTITATIVA |

Un totale di 5 µl di ciascun campione (per i Test di linea 1 e 2) o CALIBRATORI 1-4 (per i test del Kit di Setting) sono stati aggiunti ai 10µl delle Mix totali di reazione dei moduli: QC, SCR (costituita dalla Mix di reazione QC/SCR, soluzione enzimatica e il

controllo di amplificazione), QT1/QT4 (costituita dalla Mix di reazione QT1/4 e la soluzione enzimatica) fino ad ottenere un volume finale di 15 µl per ogni pozzetto. A ciascun modulo di analisi sono stati aggiunti i controlli positivi (5µl di geni sintetici contenenti le sequenze target dei 13 HPV) e i controlli negativi (5 µl di acqua priva di RNasi), al posto del template.

Una volta allestita e dispensata la mix con i campioni, la piastra è stata caricata nel termociclatore per Real-Time PCR CFX96 Touch (BioRad).

Per la rilevazione sono stati usati i 4 fluorocromi differenti: FAM, HEX, ROX e CY5.

Il profilo termico utilizzato è descritto nella tabella sottostante:

Tab.5.Profilo termico

| CICLO | RIPETIZIONE | STEP | TEMPO (min:sec) | TEMPERATURA (°C) |
|-------|-------------|-------|-----------------|------------------|
| 1 | 1 | 1 | 15:00 | 95.0 |
| 2 | 50 | 1 | 00:20 | 95.0 |
| | | 2 (*) | 00:40 | 60.0 |

Acquisire i dati di fluorescenza in Real-Time alla fine dello STEP 2 del CYCLE 2 (*). In questo passaggio, per ogni ripetizione, viene letta la fluorescenza e i dati vengono raccolti e analizzati in tempo reale.

Il grafico ottenuto alla fine del processo termico mostra i relativi dati di fluorescenza, per ciascun campione, ad ogni ciclo. Ogni segnale indica un singolo campione/pozzetto. Il report finale dell'analisi viene prodotto dai **MODULI QT** (seconda linea di test). I risultati positivi dei 13 HPV sono validi quando vengono confrontati e rispettati i dati di controllo (controllo di amplificazione del processo) determinati nel **MODULO QC**. La Tabella 6 mostra la panoramica della combinazione dei rispettivi **MODULI QT**.

Tab. 6. Combinazione dei MODULI QT e identificazione dell'HPV specifico.

| QT-1 | QT-2 | QT-3 | QT-4 | CANALE |
|--------|--------|--------|--------|------------|
| HPV-18 | HPV-33 | HPV-58 | HPV-51 | FAM |
| *EXC. | HPV-52 | *EXC. | HPV-56 | HEX |
| HPV-16 | *hGE | HPV-59 | *hGE | CY5 |
| HPV-45 | HPV-31 | HPV-35 | HPV-39 | ROX |

* I segnali provenienti dal calibratore di estrazione e dal rilevamento di hGE sono usati come controlli di amplificazione rispettivamente nei MODULI QT-1 e QT-3 e MODULI QT-2 e QT-4. Il valore del Ct utilizzato come riferimento, deve possedere il corrispondente valore ottenuto per lo stesso campione nel MODULO QC.

Come risultato della valutazione integrata dei dati dei controlli/calibratori, viene generato un fattore di correzione della carica virale specifico di ciascun campione, che consente un'accurata determinazione quantitativa della carica virale.

Il risultato finale e l'analisi relativa alla quantificazione di ciascun campione, deriva dall'elaborazione, mediante uno prototipo di software (M-STEERALG, Multiple Sample TypEs procEss contRol) che oltre a verificare che tutta la procedura analitica sia stata rispettata correttamente converte il segnale di fluorescenza rilevato (Ct) nei singoli campioni, in dato quantitativo per ciascun genotipo identificato.

Sui risultati ottenuti è stata valutata, successivamente, l'accuratezza diagnostica (sensibilità e specificità) e la concordanza tra auto-prelievo e campionamento eseguito dal clinico attraverso il test Kappa di Cohen (k). Tale concordanza è stata definita come "nulla" ($k < 0.01$), "scarsa" ($0.01 < k < 0.2$), "modesta" ($0.21 < k < 0.40$), "moderata" ($0.41 < k < 0.60$), "buona" ($0.61 < k < 0.80$), "ottima/eccellente" ($0.81 < k < 1.00$).

Inoltre, su 40 campioni biologici di auto-prelievo vaginale, analizzati nella prima parte del lavoro, è stata effettuata la ricerca di 7 principali patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmissibili *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP). Allo scopo è stato utilizzato il kit: **AnyplexII™ STI-7 (Seegene) Detection**, saggio in Real-Time PCR multiplex che consente simultaneamente l'amplificazione e l'identificazione degli acidi nucleici bersaglio identificativi di ciascun patogeno.

La presenza specifica della sequenza genica nella reazione è riportata come valore Ct (ciclo soglia) attraverso l'analisi di un software specifico che oltre a verificare che tutta la procedura analitica sia stata eseguita correttamente converte il segnale di fluorescenza rilevato nei singoli campioni in positività o negatività per la presenza del determinato patogeno. Per la rilevazione vengono usati 4 fluorocromi differenti: FAM, HEX, Cal Red 610 e 670.

4. RISULTATI

4.1. Analisi della popolazione in studio

Per il presente lavoro di tesi sono state reclutate una coorte di 140 donne di età compresa tra i 21 e i 67 anni, con un valore mediano di 38 anni, prevalentemente (87%) di origine italiana.

Dai dati raccolti dalle schede anagrafiche ed anamnestiche emerge che il 40% è dedita al fumo, il 59% riferisce di aver avuto almeno una gravidanza (il 18% almeno 1 gravidanza, il 41 % 2 o più gravidanze).

4.2. Confronto tra i risultati ottenuti con i diversi dispositivi di auto-prelievo per la ricerca degli HPV e dei patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmesse

La prima parte del presente lavoro, ha previsto l'arruolamento di 40 donne, alle quali è stato chiesto di sottoporsi ad autoprelievo vaginale con i tre differenti dispositivi *FLOQSwabs®*, *HerSwab™*, *Evalyn®Brush*.

Le partecipanti allo studio sono state suddivise in due gruppi:

- Le componenti del primo gruppo (20 pazienti) ha utilizzato i tamponi *FLOQSwabs®* e *HerSwab™*. Di queste, le prime 10, hanno impiegato, *in primis* il dispositivo *FLOQSwabs®* e successivamente il tampone *HerSwab™*. Le seconde 20 hanno utilizzato prima il tampone *HerSwab™* e in seguito *FLOQSwabs®*.
- Le partecipanti del secondo gruppo (20 pazienti) hanno invece utilizzato i tamponi *FLOQSwabs®* e *Evalyn®Brush*. Le prime 10 pazienti hanno eseguito il prelievo, *in primis*, con il dispositivo *FLOQSwabs®* e successivamente con l'*Evalyn®Brush*. Le ulteriori 10 pazienti hanno utilizzato prima il tampone *Evalyn®Brush* e in seguito il *FLOQSwabs®*.

4.2.1. Comparazione tra tampone cervicale vs *FLOQSwabs®/HerSwab™*

Analizzando i dati ottenuti dal primo gruppo di pazienti (dispositivi di auto-prelievo vaginale *FLOQSwabs®* e *HerSwab™*), emerge un ottimo livello di concordanza fra i risultati ottenuti dal campione cervicale (gold standard) e dall'auto-prelievo vaginale per la ricerca degli HPV presenti effettuata con il kit diagnostico Anyplex™ II HPV28 Detection (Tabella 7).

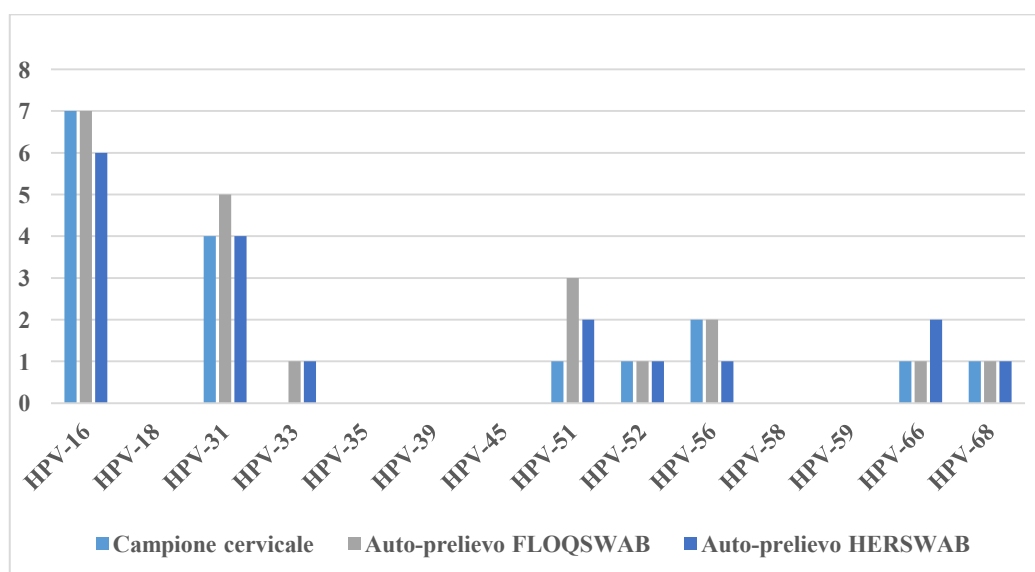
Tab. 7. Risultati dell'HPV Test tra auto-prelievo vaginale (*FLOQSwabs®/ HerSwab™*) e campione cervicale.

| | Gold Standard (tampone cervicale) | <i>FLOQSwabs®</i> (auto-prelievo) | <i>HerSwab™</i> (auto-prelievo) |
|----------------|--|--|--|
| ID Paz. | HPV HR | HPV HR | HPV HR |
| MO52 | NEG | NEG | NEG |
| MO53 | 31, 56 | 31, 56 | 31 |
| MO54 | 66 | 51, 66 | 51, 66 |
| MO55 | NEG | NEG | NEG |
| MO56 | 16 | 16 | 16 |
| MO57 | 16, 31 | 16, 31, 33 | 16, 31, 33 |
| MO58 | NEG | NEG | NEG |
| MO59 | NEG | 51 | 51 |
| MO60 | 16, 51, 56 | 16, 51, 56 | 16, 51, 56 |
| MO61 | 16 | 16 | NEG |
| MO62 | NEG | NEG | NEG |
| MO63 | 16 | 16 | 16 |
| MO64 | 16 | 16 | 16 |
| MO65 | NEG | NEG | NEG |
| MO66 | 31 | 31 | 31, 66 |
| MO67 | NEG | NEG | NEG |
| MO68 | 16 | 16 | 16 |
| MO69 | 31, 68 | 31, 68 | 31, 68 |
| MO70 | NEG | NEG | NEG |
| MO71 | 52 | 31, 52 | 31, 52 |

Al momento dell'arruolamento il 60% delle donne (12/20) presentava una positività per l'infezione da HR-HPV, rilevata dall'analisi molecolare del tampone cervicale, mentre il 65% (13/20) ha evidenziato una positività nel tampone **FLOQSwabs®** e del 60% (12/20) in quello **HerSwab™**.

I genotipi HR-HPV, maggiormente riscontrati sono stati: HPV16, HPV31, HPV51, HPV56, in tutte e tre le tipologie di campione, come mostrato nel dettaglio, nella figura 20.

Fig.20. Prevalenza tra auto-prelievo vaginale(FLOQSwabs®/ HerSwab™) e campione cervicale



Applicando ai risultati ottenuti il test di concordanza (K di Cohen), emerge una concordanza di 0,95 tra il cervicale e l'auto-prelievo FLOQSwabs® e del 0,90 tra cervicale e HerSwab™.

| | | Campione cervicale | | |
|------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo FloqSwab | Positivi | 12 | 1 | 13 |
| | Negativi | 0 | 7 | 7 |
| | | 12 | 8 | 20 |

k= 0,95

| | | Campione cervicale | | |
|--------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo HERSwab | Positivi | 11 | 1 | 12 |
| | Negativi | 1 | 7 | 8 |
| | | 12 | 8 | 20 |

$k = 0,9$

Inoltre, in parallelo, sugli stessi campioni, è stato riscontrato un ottimo livello di concordanza confrontando i dati ottenuti riguardanti la ricerca dei principali patogeni responsabili delle malattie sessualmente trasmesse (STIs) (Tabella 8):

Tab.8. Risultati dell' STIs tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®/ HerSwab™) e campione cervicale

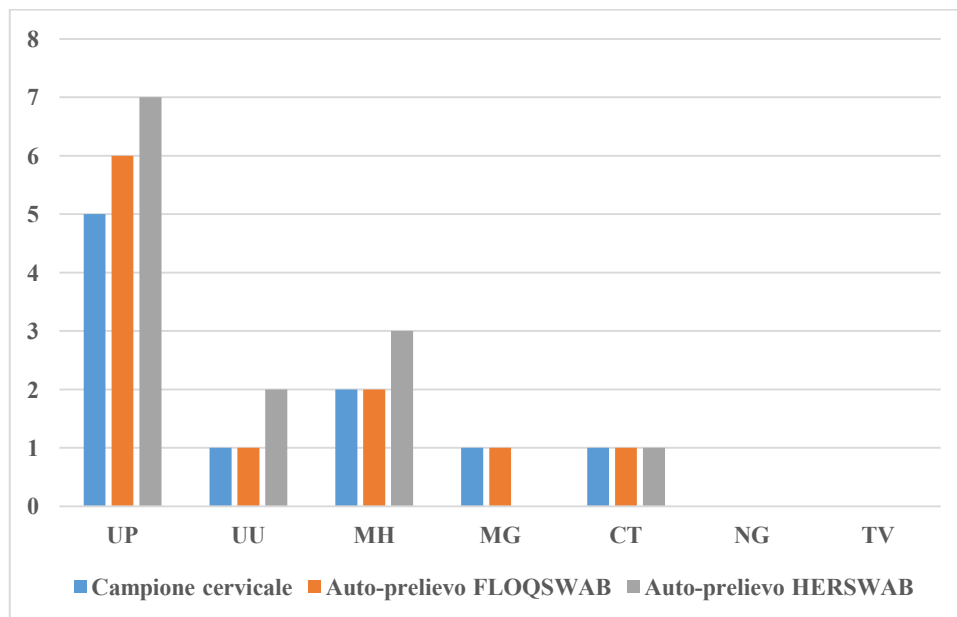
| | Gold Standard (tampono cervicale) | FLOQSwabs® (auto-prelievo) | HerSwab™ (auto-prelievo) |
|----------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| ID Paz. | STIs | STIs | STIs |
| MO52 | NEG | NEG | NEG |
| MO53 | NEG | NEG | NEG |
| MO54 | NEG | NEG | UP |
| MO55 | NEG | NEG | NEG |
| MO56 | NEG | NEG | NEG |
| MO57 | UP | UP | UP |
| MO58 | UP | UP | UP |
| MO59 | UP | UP | UP |
| MO60 | UP, MH | UP, MH | UP, MH |
| MO61 | NEG | NEG | NEG |
| MO62 | NEG | NEG | NEG |
| MO63 | MH, MG, CT | MH, MG, CT | MH, CT |
| MO64 | UU | UU | UU |
| MO65 | NEG | NEG | NEG |
| MO66 | UP | UP | UU, UP, MH |
| MO67 | NEG | NEG | NEG |
| MO68 | NEG | NEG | NEG |
| MO69 | NEG | NEG | NEG |
| MO70 | NEG | NEG | NEG |
| MO71 | NEG | UP | UP |

**Ureaplasmaparvum* (UP);*Mycoplasmahominis* (MH); *Mycoplasmagenitalium* (MG);
Chlamydia trachomatis (CT);*Ureaplasmaurealyticum* (UU)

Per quanto concerne la ricerca dei principali patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmissibili (STIs), si è rilevata una positività del 35% (7/20), 40% (8/20), 45% (9/20), rispettivamente nel tampone cervicale, **FLOQSwabs®** e **HerSwab™**.

In Figura 21 vengono illustrati i patogeni maggiormente presenti (*Ureaplasma parvum*,UP, *Mycoplasma hominis*,MH) in tutte e tre le tipologie di campioni.

Fig. 21. Prevalenza STIs tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®/ HerSwab™) e campione cervicale



Applicando ai risultati ottenuti il test di concordanza (K di Cohen), emerge una concordanza di 0,95 tra il cervicale e l'auto-prelievo FLOQSwabs® e del 0,90 tra cervicale e HerSwab™.

| | | Campione cervicale | | |
|------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo FlogSwab | Positivi | 7 | 1 | 8 |
| | Negativi | 0 | 12 | 12 |
| | | 7 | 13 | 20 |

$k=$ 0,95

| | | Campione cervicale | | |
|--------------------------|----------|--------------------|----------|--------|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo HERSWAB | Positivi | 7 | 2 | k= 0,9 |
| | Negativi | 0 | 11 | |
| | | 7 | 13 | 20 |

4.2.2. Comparazione tra tampone cervicale vs *FLOQSwabs®/Evalyn®Brush*

In riferimento ai dati ottenuti dal secondo gruppo di pazienti che hanno utilizzato i dispositivi di auto-prelievo vaginale *FLOQSwabs®* ed *Evalyn®Brush*, il confronto, mostrato nella tabella 9, tra il campione cervicale (gold standard) e i campioni di auto-prelievo vaginale, ha mostrato un ottimo livello di concordanza.

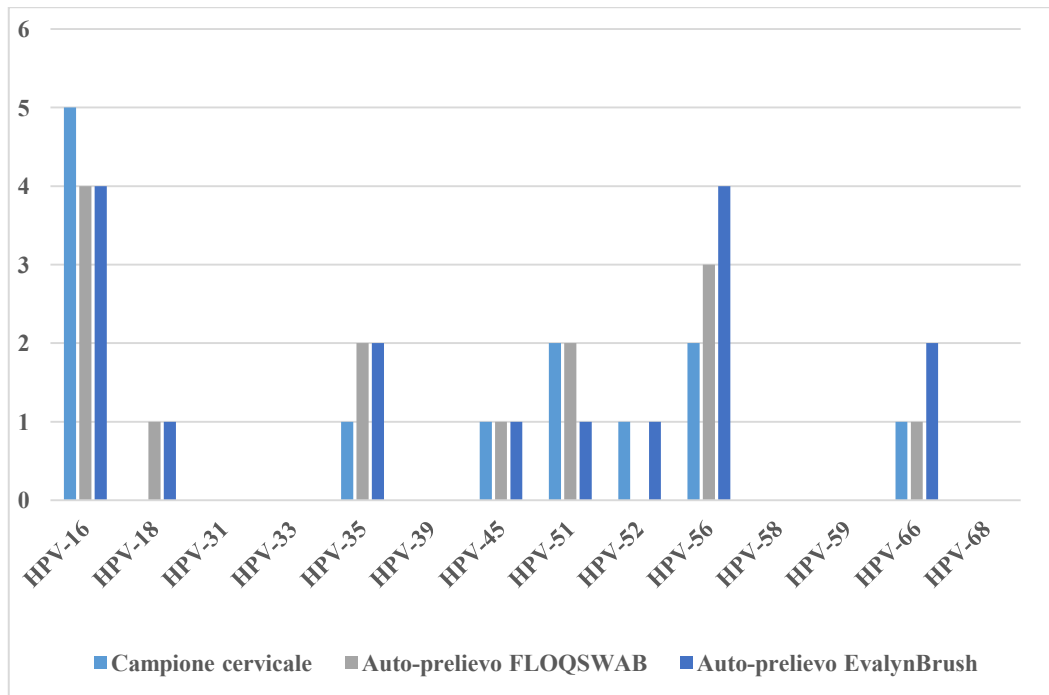
Dai risultati ottenuti dall'analisi con il kit Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene), è stata rilevata una positività ad HR-HPV del 55% (11/20), per quanto riguarda il tampone cervicale, il 50% (10/20) ha evidenziato una positività con l'utilizzo del tampone di auto-prelievo vaginale *FLOQSwabs®*, e una positività da HR-HPV del 55% (11/20) al prelievo con il tampone *Evalyn®Brush*.

Tab. 9. Risultati dell'HPV Test tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®/ Evalyn®Brush) e campione cervicale.

| | Gold Standard (tampono cervicale) | FLOQSwabs® (auto-prelievo) | Evalyn®Brush (auto-prelievo) |
|----------------|--|---------------------------------------|---|
| ID Paz. | HPV HR | HPV HR | HPV HR |
| MO72 | NEG | NEG | NEG |
| MO73 | 16 | 16 | 16 |
| MO74 | 16 | 16 | 16 |
| MO75 | 45 | 45 | 45 |
| MO76 | 16 | NEG | NEG |
| MO77 | 56 | 35, 56 | 35, 56 |
| MO78 | NEG | NEG | NEG |
| MO79 | NEG | NEG | 56 |
| MO80 | NEG | NEG | NEG |
| MO81 | 66 | 66 | 66 |
| MO82 | NEG | NEG | 66 |
| MO83 | 16 | 16, 18, 56 | 16, 18, 56 |
| MO84 | NEG | NEG | NEG |
| MO85 | 16, 56 | 16, 56 | 16, 56 |
| MO86 | NEG | NEG | NEG |
| MO87 | 51 | 51 | NEG |
| MO88 | 35 | 35 | 35 |
| MO89 | NEG | NEG | NEG |
| MO90 | NEG | NEG | NEG |
| MO91 | 51, 52 | 51 | 51, 52 |

In questo caso, i genotipi HR-HPV, maggiormente riscontrati sono stati: HPV16, HPV35, HPV51, HPV56, in tutte e tre le tipologie di campione, come mostrato nel dettaglio, in figura 22.

Fig. 22. Prevalenza tra auto-prelievo vaginale(FLOQSwabs®/ Evalyn®Brush) e campione cervicale



Applicando ai risultati ottenuti il test di concordanza (K di Cohen), emerge una concordanza di 0,95 tra il cervicale e l'auto-prelievo FLOQSwabs® e del 0,80 tra cervicale e Evalyn®Brush.

| | | Campione cervicale | | |
|------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo FloqSwab | Positivi | 10 | 0 | 10 |
| | Negativi | 1 | 9 | 10 |
| | | 11 | 9 | 20 |

k= 0,95

| | | Campione cervicale | | |
|---------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo EvalynBrush | Positivi | 9 | 2 | 11 |
| | Negativi | 2 | 7 | 9 |
| | | 11 | 9 | 20 |

k= 0,8

Un ottimo livello di concordanza è stato riscontrato confrontando i dati ottenuti tra il gold standard e gli auto-prelievi (Tabella 10), riguardanti la ricerca dei principali patogeni responsabili delle malattie sessualmente trasmesse (STIs).

Tab. 10. Risultati dell' STIs tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®/ Evalyn®Brush) e campione cervicale

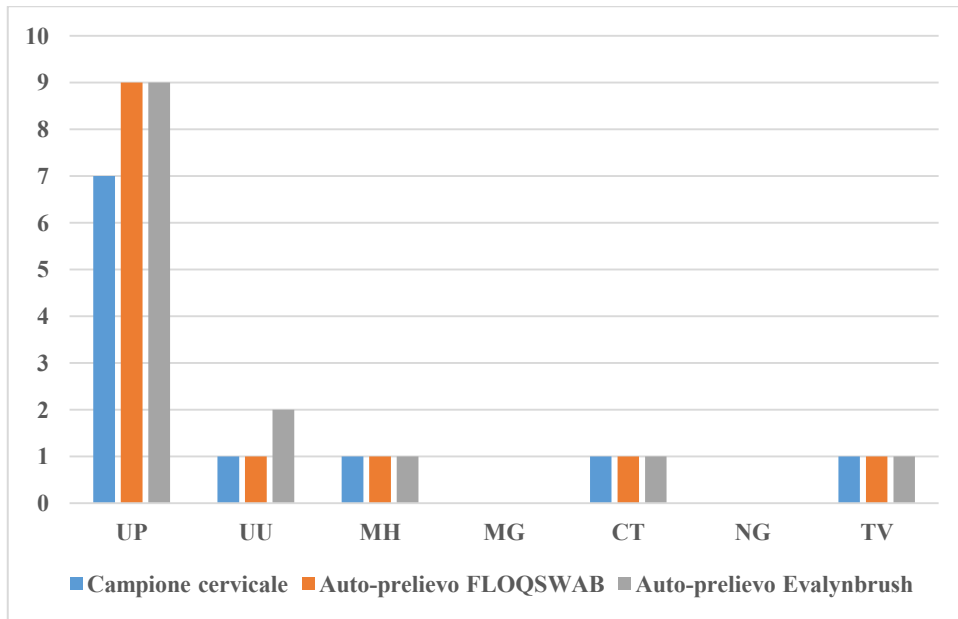
| | Gold Standard (tampono cervicale) | FLOQSwabs® (auto-prelievo) | Evalyn®Brush (auto-prelievo) |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| ID Paz. | HPV HR | HPV HR | HPV HR |
| MO72 | STIs | STIs | STIs |
| MO73 | UP | UP | UP |
| MO74 | NEG | UP | UU, UP |
| MO75 | UP | UP | UP |
| MO76 | NEG | UP | UP |
| MO77 | NEG | NEG | NEG |
| MO78 | NEG | NEG | NEG |
| MO79 | UP | UP | UP |
| MO80 | UP | UP | UP |
| MO81 | NEG | NEG | NEG |
| MO82 | NEG | NEG | NEG |
| MO83 | NEG | NEG | NEG |
| MO84 | UP, CT, TV | UP, CT, TV | UP, CT, TV |
| MO85 | NEG | NEG | NEG |
| MO86 | NEG | NEG | NEG |
| MO87 | NEG | NEG | NEG |
| MO88 | UP | UP | UP |
| MO89 | NEG | NEG | NEG |
| MO90 | NEG | NEG | NEG |
| MO91 | NEG | NEG | NEG |

**Ureaplasmaparvum* (UP); *Mycoplasma hominis* (MH); *Mycoplasma genitalium* (MG);
Chlamydia trachomatis (CT); *Ureaplasma urealyticum* (UU)

In riferimento alla ricerca dei principali patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmissibili (STIs), la percentuale di positività è stata del: 35% (7/20), 45% (9/20), 45% (9/20), rispettivamente per il tampono cervicale, il tampono di auto-prelievo **FLOQSwabs®** e il tampono **Evalyn®Brush**.

Il patogeno principalmente rilevato è stato rappresentato dall' *Ureaplasma parvum*, UP, in tutte e tre le tipologie di campioni, come illustrato in figura 23.

Fig.23. Prevalenza STIs tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®/ Evalyn®Brush) e campione cervicale



Applicando ai risultati ottenuti il test di concordanza (K di Cohen), emerge una concordanza di 0,90 tra il cervicale e l'auto-prelievo FLOQSwabs® e del 0,90 tra cervicale e Evalyn®Brush.

| | | Campione cervicale | | |
|------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo FloqSwab | Positivi | 7 | 2 | 9 |
| | Negativi | 0 | 11 | 11 |
| | | 7 | 13 | 20 |

k= 0,9

| | | Campione cervicale | | |
|---------------------------|----------|--------------------|----------|----|
| | | Positivi | Negativi | |
| Auto-prelievo Evalynbrush | Positivi | 7 | 2 | 9 |
| | Negativi | 0 | 11 | 11 |
| | | 7 | 13 | 20 |

k= 0,9

4.2.3. Analisi dei questionari di gradimento relativi all'utilizzo dei dispositivi di self-collection

Per quanto riguarda l'analisi dei questionari di gradimento relativi all'impiego dei dispositivi di auto-prelievo vaginale *FLOQSwab*[®], *HerSwab*[™] e *Evalyn*[®]*Brush* per le 40 pazienti reclutate nella prima parte del progetto si è registrato, nel complesso, un buon grado di soddisfazione. La quasi totalità delle pazienti ha giudicato semplici le operazioni di estrazione del tampone dalla custodia, il suo inserimento nella vagina e la rotazione per eseguire il prelievo (i giudizi riguardanti questi aspetti sono tutti collocati nelle categorie "molto facile" o "facile"). Nessuna paziente ha riferito di aver avvertito dolore durante l'esecuzione dell'auto-prelievo. Un 10% (2/20) delle pazienti, ha riferito perdita di sangue durante il prelievo, effettuato con il tampone vaginale *HerSwab*[™].

Il reinserimento del tampone nella custodia al termine del prelievo è stato giudicato anch'esso agevole e non sono state registrate segnalazioni di particolari difficoltà.

Le istruzioni fornite per l'esecuzione dell'auto-prelievo sono state giudicate chiare e comprensibili dalla totalità delle pazienti e l'intera procedura è stata giudicata facile con parere unanime.

La quasi totalità delle pazienti preferirebbe l'auto-prelievo vaginale rispetto a quello eseguito dallo specialista con preferenza per il tampone *FLOQSwab*[®] rispetto agli altri due *devices* (Figure. 30 e 31).

Fig. 24. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo *FLOQSwabs*[®]

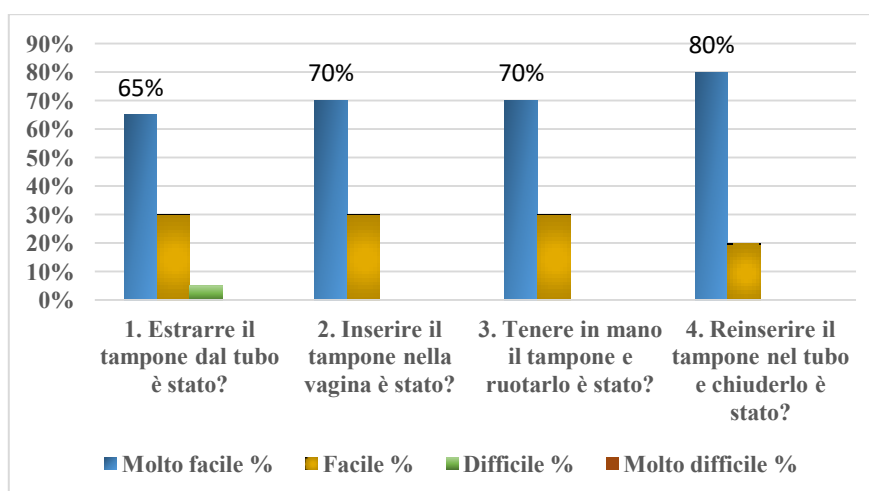


Fig. 25. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo FLOQSwabs®

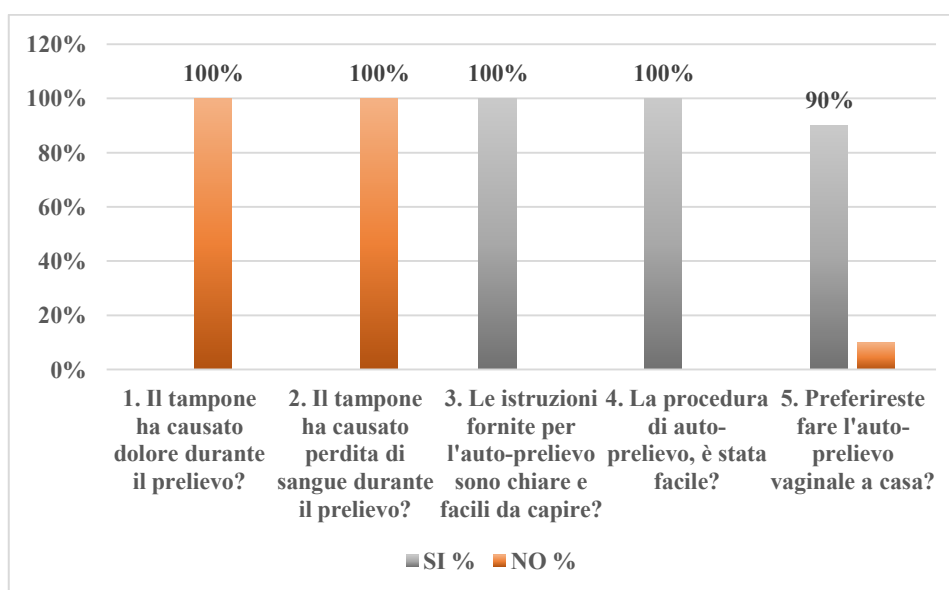


Fig. 26. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo HerSwab™

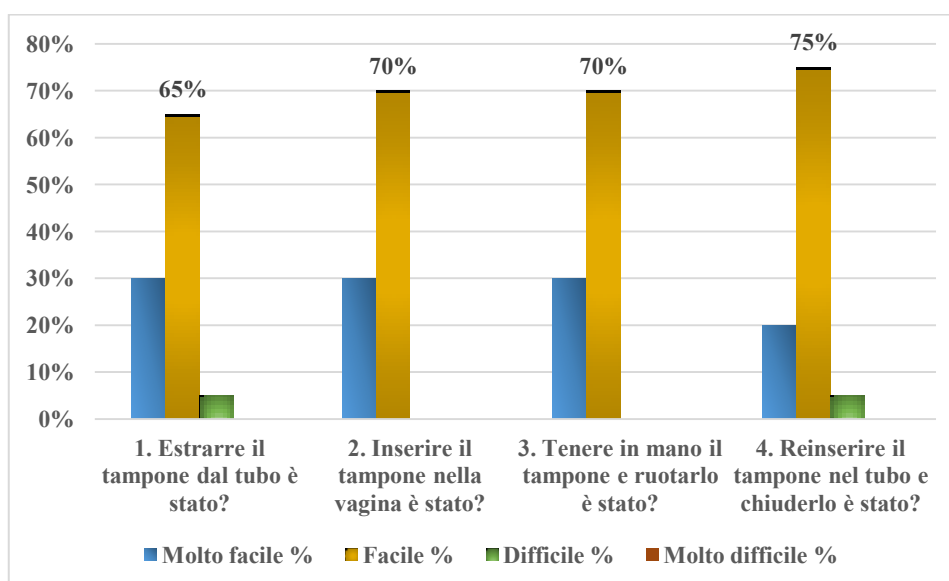


Fig. 27. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo HerSwab™

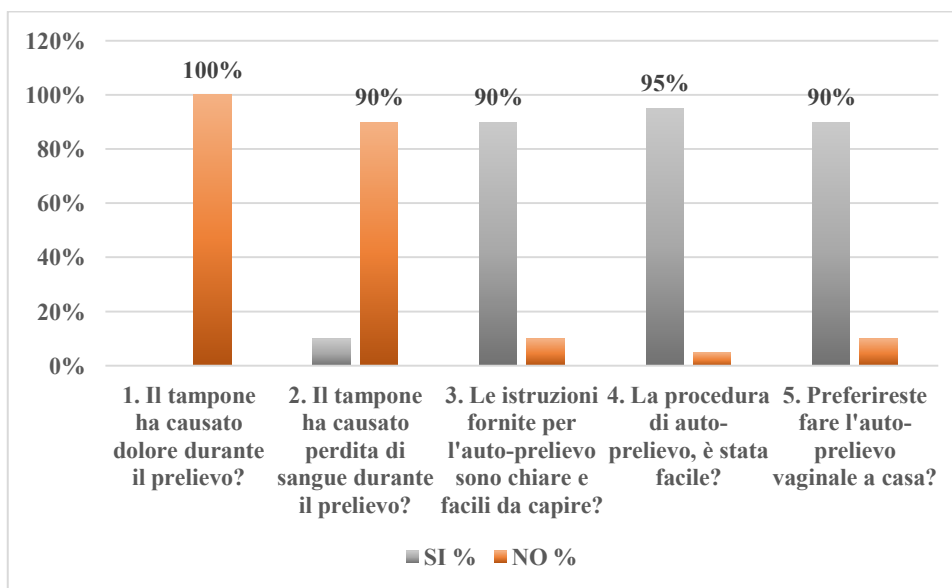


Fig. 28. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo Evalyn®Brush

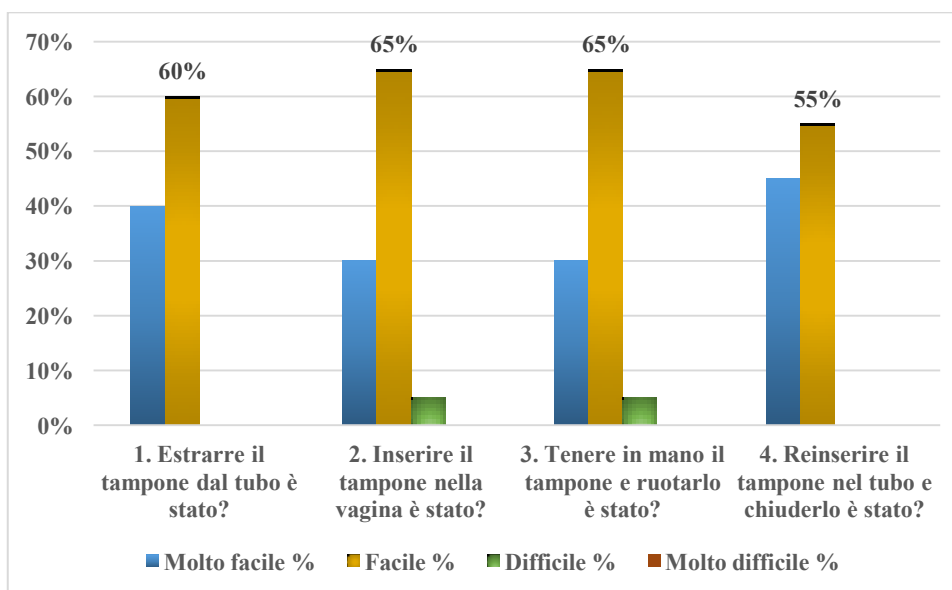


Fig. 29. Questionario di gradimento per il tampone di auto-prelievo Evalyn®Brush

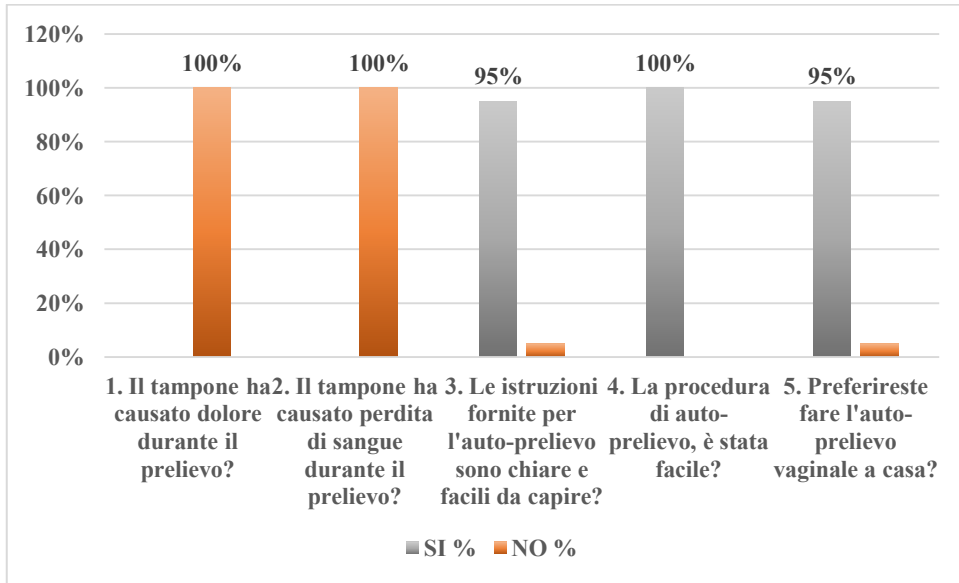


Fig. 30. Preferenza tra il tampone FLOQSwabs® versus HerSwab™

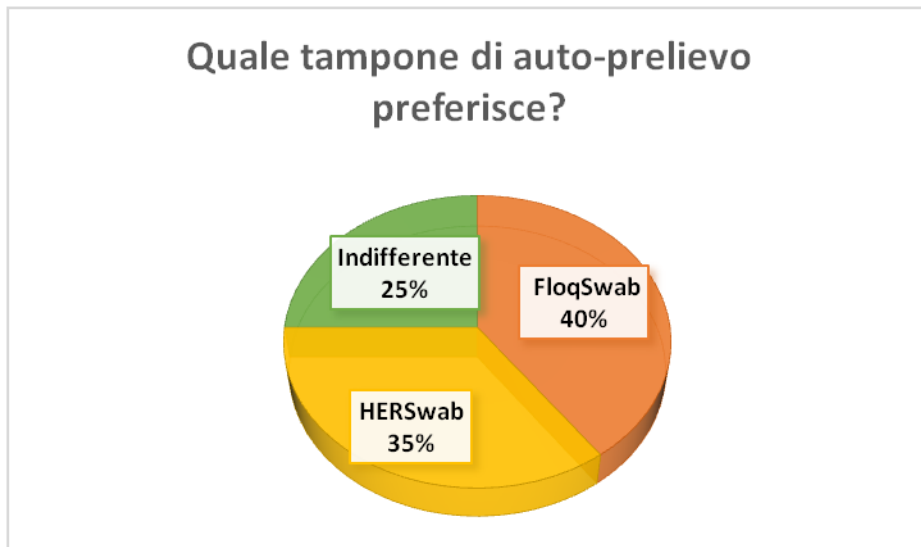
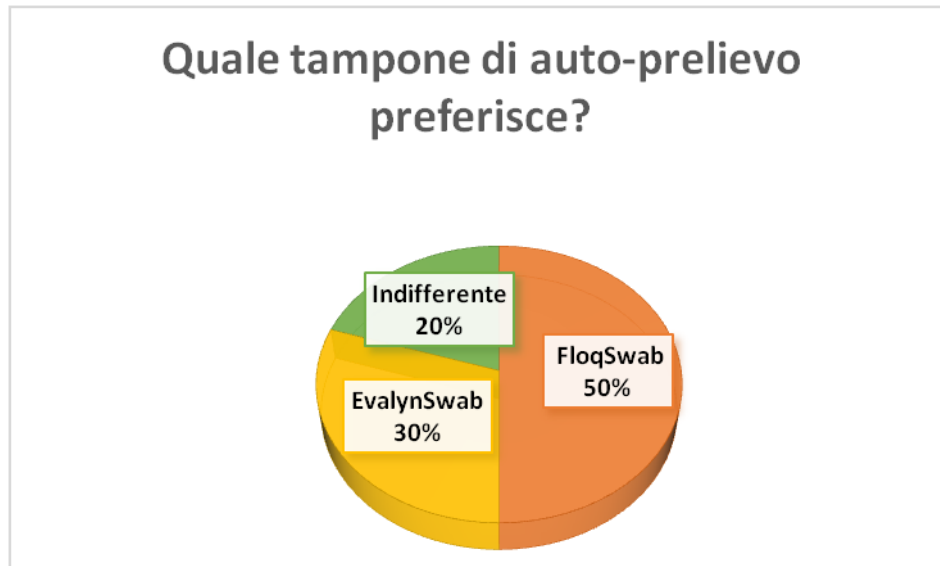


Fig. 31. Preferenza tra il tampone FLOQSwabs® versus Evalyn®Brush



4.3. Validazione analitica del kit diagnostico OncoPredict su campioni cervicali (CCC), auto-prelievo vaginale (SV) e primo mitto di urina (FVU)

La seconda parte del presente lavoro, ha previsto l'arruolamento di 100 donne con una documentata displasia cervicale (LSIL, ASCUS, ACG-US, ASCH o HSIL) riferite per esame colposcopio presso la clinica Ginecologica dell'Ospedale San Gerardo di Monza. Tutte le pazienti sono state sottoposte a prelievo cervicale effettuato dallo specialista, con il tampone *L-Shaped Endocervical/Esocervical FloqSwab*[®], ad auto-prelievo sia vaginale, con l'utilizzo del *device FLOQSwabs*[®], sia con la raccolta del primo mitto di urina con il sistema *Colli-Pee*[™]. Nel complesso, sono stati raccolti un totale di 300 campioni successivamente analizzati sia con il kit OncoPredict che con il kit Anyplex[™] II HPV28 Detection.

Prima di procedere con l'analisi dei campioni, è stato utilizzato il modulo OncoPredict-QC (controllo di qualità) al fine di verificare la conformità diagnostica del campione in termini di sufficiente efficienza di estrazione, amplificazione e adeguatezza (cellularità). 4 su 100 campioni cervicali (CCC) sono risultati non adeguati, mentre

piena conformità si è rilevata sia per i 100 campioni di auto-prelievo vaginale (SV) sia per i 100 campioni del primo mitto di urina (FVU). Inoltre, è stata anche calcolata, nelle tre diverse tipologie di campione biologico la cellularità totale del DNA umano, come riportato nella seguente tabella 11.

Tab. 11. Cellularità totale del DNA genomico umano da un singolo tampone CCC (espresso in numero di cellule), un singolo tampone SV (espresso in numero di cellule) e 20 mL di FVU (espresso in numero di copie di DNA genomico umano).

| | CCC | SV | FVU |
|-----------------------|---------------|----------------|----------------|
| | 96/100 | 100/100 | 100/100 |
| MEDIA | 1,33E+06 | 1,88E+06 | 6,33E+06 |
| MEDIANA | 1,87E+05 | 1,52E+06 | 2,14E+06 |
| VALORE MASSIMO | 8,09E+06 | 7,66E+06 | 1,01E+08 |
| VALORE MINIMO | 1,01E+05 | 1,54E+05 | 1,08E+05 |

4.3.1. Confronto tra il kit OncoPredict (SCR e QT1/4) e Anyplex™ II HPV28

Il kit OncoPredict utilizza sei moduli di reazioni, in due combinazioni specifiche, determinando due linee di test. Nella prima linea di test, viene utilizzato il modulo SCR (Screening) per la determinazione degli HPV16, HPV18 ed un pool di 11 diversi HPV (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68 a/b).

Nella seconda linea di test, il kit utilizza quattro moduli di reazioni (QTs- Tipizzazione Quantitativa), ciascuno dei quali rileva la quantità specifica di tre HPV indipendenti (QT-1: HPV16-18-45, QT-2: HPV33-31-52, QT -3: HPV58-35-59, QT-4: HPV51-39-56).

Utilizzando i dati ottenuti dai campioni clinici analizzati nel presente studio, abbiamo confrontato le prestazioni del kit OncoPredict con quelle ottenute utilizzando il kit marcato CE-IVD Anyplex™ II HPV28-Seegene.

I risultati hanno mostrato un ottimo accordo nella positività riscontrata nei diversi campioni con i due kit (Tabella 12 e Tabella 13).

Tab. 12. Confronto tra percentuale di positività riscontrata nei campioni cervicali con il kit HPV Oncopredict (fase di screening) e con il kit Anyplex™ II HPV28.

| CAMPIONE CERVICALE (CCC) | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| HPV | Anyplex™ II HPV28 (%) | OncoPredict-SCR (%) |
| HPV-16 | 26,5 | 26,5 |
| HPV-18 | 3,6 | 4,8 |
| 11 HPV s | 55,4 | 56,6 |

Tab. 13. Confronto tra percentuali di positività riscontrata nei campioni cervicali con il kit HPV Oncopredict (genotipizzazione) e con il kit Anyplex™ II HPV28.

| CAMPIONE CERVICALE (CCC) | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| HPV | Anyplex™ II HPV28 (%) | OncoPredict-QT1/4 (%) |
| 16 | 26,0 | 25,0 |
| 18 | 5,2 | 5,2 |
| 31 | 20,8 | 23,9 |
| 33 | 3,1 | 4,1 |
| 35 | 3,1 | 4,1 |
| 39 | 6,2 | 8,3 |
| 45 | 3,1 | 2,0 |
| 51 | 11,4 | 15,6 |
| 52 | 9,3 | 9,3 |
| 56 | 10,4 | 16,6 |
| 58 | 11,4 | 14,5 |
| 59 | 6,2 | 7,2 |

4.3.2. Performance analitica del kit OncoPredict nell'identificazione del genotipo-specifico di HPV da campioni cervicali (CCC), auto-prelievo vaginale (SV) e primo mitto di urina (FVU).

La valutazione comparativa dei risultati ottenuti tra i moduli OncoPredict-SCR e OncoPredict-QT 1/4 ha evidenziato un accordo di livello ottimale con un elevato numero di campioni positivi selezionati nel primo passaggio (SCR) confermati nel secondo passaggio (QT 1/4) (tabella 14).

Tab.14. Percentuale di positività riscontrata con OncoPredict-SCR e OncoPredict-QT in campioni di CCC, SV e FVU.

* Numero di campioni che raggiungono la conformità diagnostica.

| | | HPV-16 (%) | HPV-18 (%) | 11 HPV s (%) |
|--------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| CCC (*96 campioni) | SCR | 26,5 | 4,8 | 56,6 |
| | QT1/4 | 26,5 | 3,6 | 54,2 |
| SV (*100 campioni) | SCR | 28,9 | 4,8 | 57,8 |
| | QT1/4 | 28,9 | 2,4 | 54,2 |
| FVU (*100 campioni) | SCR | 36,1 | 2,4 | 53,0 |
| | QT1/4 | 27,7 | 2,4 | 50,6 |

I campioni risultati negativi, nella prima fase con OncoPredict-SCR, sono stati ritestati con OncoPredict-QT 1/4, che ha confermato i dati del primo step (dati non mostrati).

Il modulo OncoPredict-SCR della prima linea di test, utilizzato al fine di screenare i campioni positivi per HPV, ha evidenziato percentuali di positività del 65,1%, 68,7% e 66,3%, rispettivamente per i campioni CCC, SV e FVU.

Le percentuali corrispondenti agli HPV16, HPV18 e 11HPV come cluster (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68 a/b) per ciascuna tipologia di campione, sono riassunti nella tabelle 15-16.

Tab. 15. Confronto di positività nel CCC rispetto all'auto-prelievo vaginale (SV).

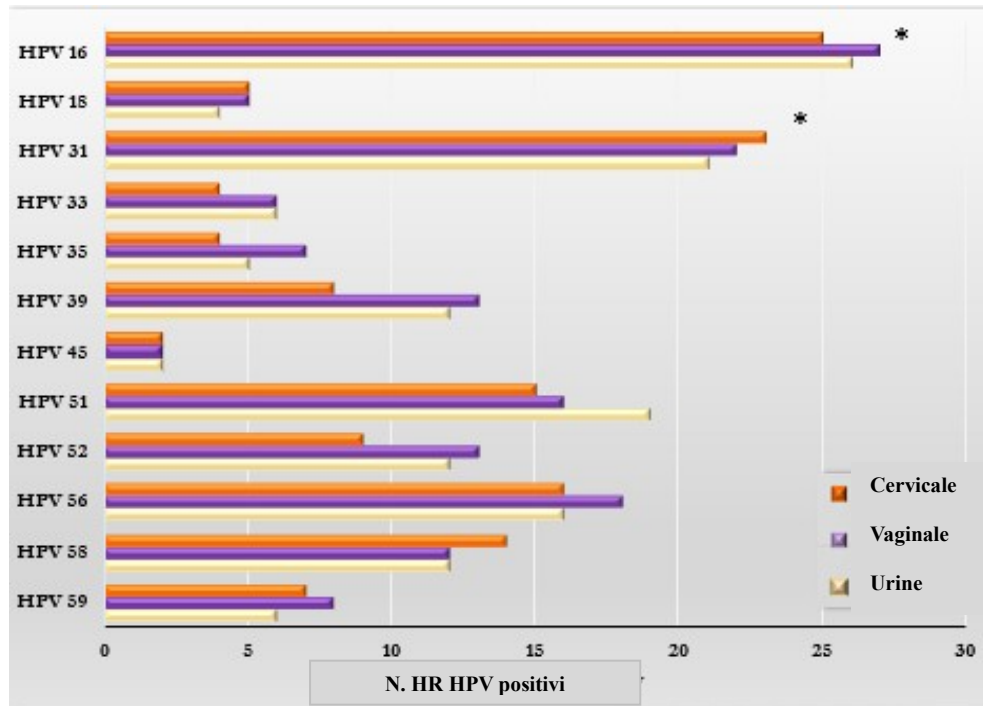
| OncoPredict-SCR | | |
|---------------------------|--------------------|-------------------|
| HPV (%) | CCC (%) | SV (%) |
| HPV-16 | 26,5 | 28,9 |
| HPV-18 | 4,8 | 4,8 |
| 11 HPV_s | 56,6 | 57,8 |

Tab. 16. Confronto di positività nel CCC rispetto all'auto-prelievo del primo mitto di urina (FVU).

| OncoPredict-SCR | | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| HPV (%) | CCC (%) | FVU (%) |
| HPV-16 | 26,5 | 36,1 |
| HPV-18 | 4,8 | 2,4 |
| 11 HPV_s | 56,6 | 53,0 |

I campioni HPV positivi allo screening sono stati testati nella seconda linea di test, utilizzando i quattro moduli (QTs-Tipizzazione Quantitativa), ciascuno dei quali ha rilevato la quantità genotipo specifica di tre HPV indipendenti (QT-1: HPV16-18-45, QT-2: HPV33 -31-52, QT-3: HPV58-35-59, QT-4: HPV51-39-56). In particolare, i genotipi HPV16 e HPV31 sono risultati i più frequenti nelle tre tipologie di prelievo, seguiti da HPV51 per FVU e HPV56 per SV (Figura 32).

Fig. 32. Prevalenza HPV identificata in CCC,SV ed FVU.
***Genotipi maggiormente presenti in tutte le tipologie di campione**



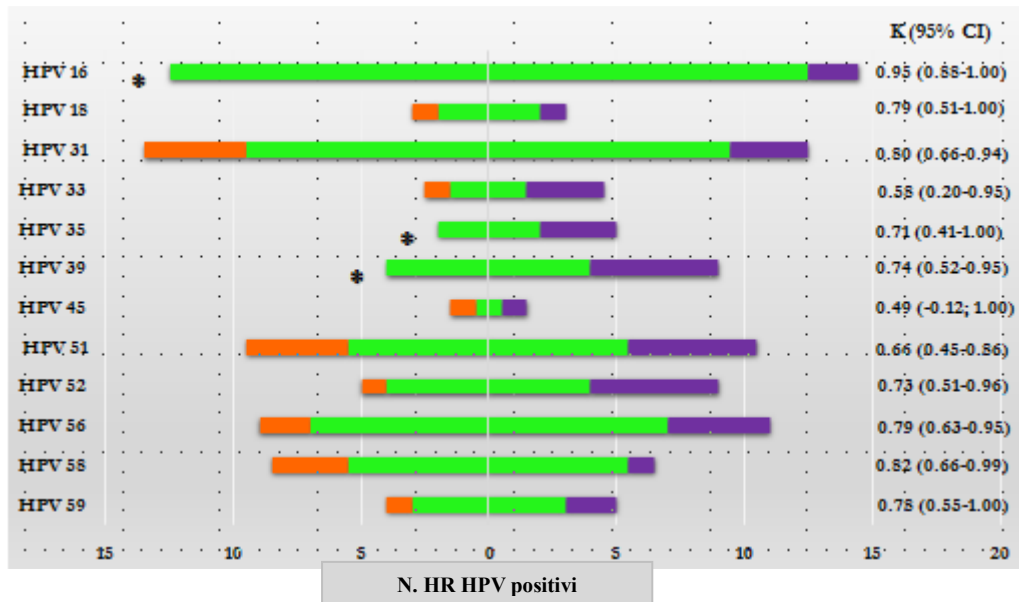
L'accuratezza dell'HPV test eseguita con il kit Oncopredict, saggiata sui campioni prelevati tramite i dispositivi utilizzati per l'auto-prelievo è stata valutata analizzando la concordanza analitica tra l'esito del test ottenuto dai campioni da auto-prelievo e quello ottenuto dal campione cervicale.

L'identificazione su base genotipo specifica per le tre differenti tipologie di campione, è mostrata nella figura 33, per i campioni di auto-prelievo vaginale.

HPV16-35-39 hanno rappresentato i casi ideali, dove non sono state perse le positività nel CCC, utilizzando anche l'auto-prelievo vaginale (SV). Applicando il test di concordanza (K di Cohen) è emersa una concordanza ottima per HPV16 ($k = 0.95$), HPV58 ($k = 0.82$) e HPV31 ($k = 0.80$).

Fig. 33. Somma di campioni positivi solo in CCC (barre arancioni), solo in SV (barre viola) e, contestualmente, sia in CCC che in FVU (barre verdi), con rispettiva Kappa di Cohen (κ).

*Caso ideale.

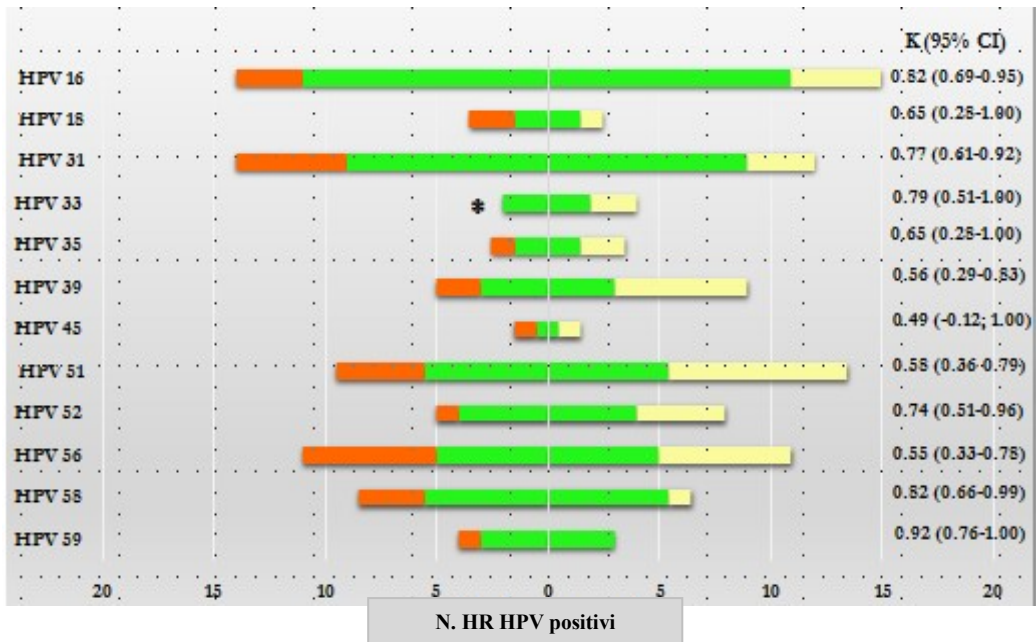


Analogamente, i risultati ottenuti, confrontando il tampone cervicale e l'auto-prelievo dell'urina, sono mostrati nella figura 34. In questo caso, HPV33 ha rappresentato il caso ideale, dove non sono state perse positività nel CCC, utilizzando anche l'auto-prelievo dell'urina (FVU).

Il test di concordanza (K di Cohen) ha evidenziato una concordanza ottima per HPV59 ($k = 0.92$), HPV58 ($k = 0.82$) e HPV16 ($k = 0.82$).

Fig. 34. Somma di campioni positivi sin CCC (barre arancioni), solo in FVU (barre gialle) e, contestualmente, sia in CCC che in FVU (barre verdi), con rispettiva Kappa di Cohen (κ).

*Caso ideale.



4.3.3. Determinazione della carica virale genotipo specifica in campioni CCC e auto-prelievo SV e FVU

Le Figure 35 e 36 mostrano le differenze di VL genotipo specifico nei campioni prelevati in auto-prelievo rispetto al gold standard (CCC).

Inoltre, con l'obiettivo di utilizzare la carica virale come un importante biomarker nel CCC, sembra interessante confrontare il profilo dei valori di carica virale specifici del genotipo nei campioni di CCC con quelli ottenuti da campioni di auto-prelievo.

La Figura 35 mostra le cariche virali genotipo specifiche da CCC e SV e la Figura 36 mostra quelle da CCC e FVU.

Fig. 35. Cariche virali di HR-HPV in base al tipo di campione (CCC vs SV). Il log HPV UI trasformato per 10.000 cellule di estratto di DNA in CCC (barre arancioni) e SV (barre viola). Sono riportate le barre mediane e SD.

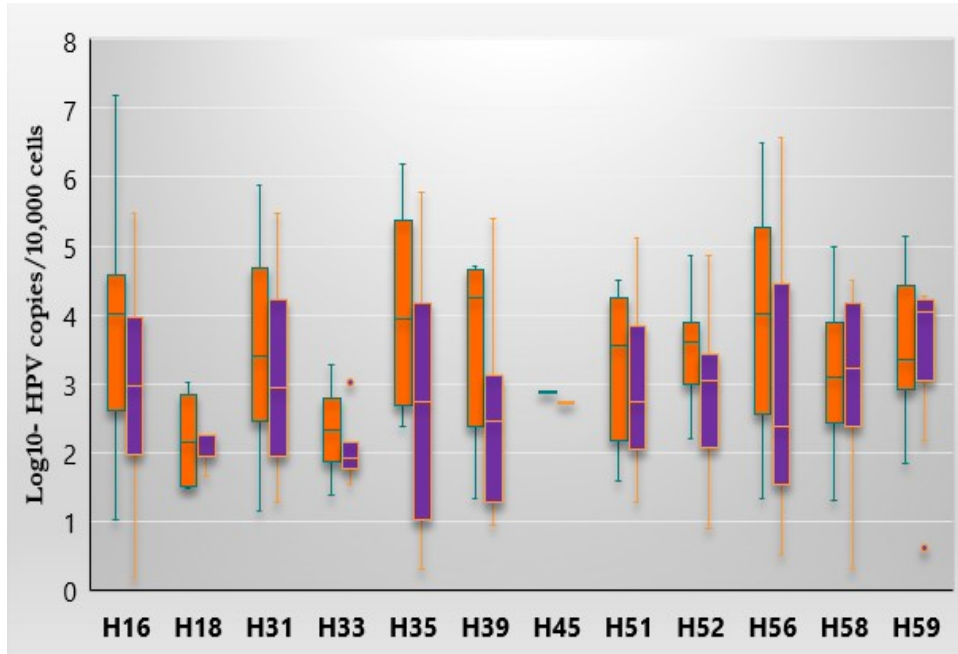
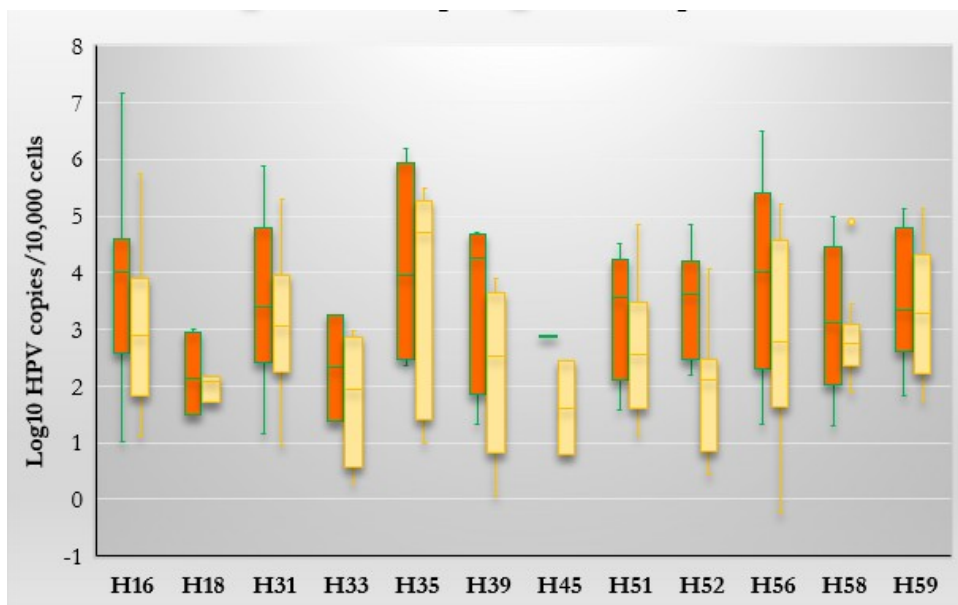


Fig. 36. Cariche virali HR-HPV in base al tipo di campione (CCC vs FVU). Il log HPV UI trasformato per una quantità di DNA genomico umano equivalente a 10.000 cellule, CCC (barre arancioni) e FVU (barre gialle). Sono riportate le barre mediane e SD.



Ad una visione generale, i profili delle cariche virali genotipo specifiche nei tre tipi di campioni sembrano essere molto simili (Figura 35 e Figura 36), riscontrando una maggiore prevalenza dei genotipi HPV16, HPV31, HPV35, HPV56. Sono stati evidenziati valori più elevati di carica virale nei campioni cervicali prelevati dal clinico (CCC) rispetto ai campioni di auto-prelievo (SV e FVU).

Vista la numerosità campionaria, sono stati riportati i dati medi di carica virale, HPV-16 è stato il più presente nel distretto cervicale (177629,0 UI / 10.000 cellule), seguito da HPV-56 (44129,9 UI / 10.000 cellule) e nel distretto vaginale più presente HPV-56 (41238,8 UI / 10.000 cellule) seguito da HPV-16 (8396,7 UI / 10.000 cellule), mentre il più presente nel primo mitto di urina, HPV-16 (8008,1 UI / 10.000 copie di hgDNA) seguito da HPV-31 (5079,8 UI / 10.000 copie hgDNA); al contrario, HPV-18 è stato il meno presente nel distretto cervicale (16,9 UI / 10.000 cellule) seguito dall'HPV-33 (18,8 UI / 10.000 cellule); HPV-18 è stato il meno presente anche nel distretto vaginale (4,1 UI / 10.000 cellule), seguito da HPV-33 (13,8 UI / 10.000 cellule) e HPV-45 è stato il meno presente nel primo mitto di urina (2,8 Copie IU / hgDNA), seguito da HPV-33 (15,9 copie IU / hgDNA).

5. DISCUSSIONE

Il carcinoma cervicale è la prima neoplasia riconosciuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come totalmente riconducibile ad un'infezione. Il carcinoma della cervice è infatti causato dall'infezione genitale da virus del papilloma umano (HPV).

I diversi tipi di HPV vengono infatti distinti in basso e alto rischio di trasformazione neoplastica. I genotipi a basso rischio sono associati a lesioni benigne come i condilomi anogenitali, mentre quelli ad alto rischio, cui appartengono 14 tipi oncogenici di HPV che vengono virtualmente rilevati in tutte le lesioni carcinomatose, sono associati al cancro cervicale oltre che ad altri tumori del tratto anogenitale, come per esempio il carcinoma del pene, della vulva, della vagina e dell'ano.

In Italia 8 donne su 10, fra i 25 e i 64 anni, si sottopongono a scopo preventivo allo screening cervicale (Pap-test o HPV test), o all'interno di programmi organizzati o per iniziativa personale, secondo quanto raccomandato dalle linee guida nazionali che suggeriscono alle donne di 25-64 anni di sottoporsi allo screening ogni tre anni per la diagnosi precoce del tumore della cervice uterina (Dati Passi 2014-2017).

La quota di donne che si sottopone allo screening cervicale è maggiore fra quelle socioeconomicamente più avvantaggiate, per condizioni economiche o istruzione, fra le donne di cittadinanza italiana rispetto alle straniere e fra le coniugate o conviventi rispetto alle donne non coniugate e non conviventi.

Se nel corso degli anni si è registrato un incremento statisticamente significativo della popolazione femminile che fa prevenzione, determinato per lo più da un aumento della copertura dello screening organizzato, il 12% delle donne riferisce di non essersi mai sottoposta allo screening cervicale e il 9% di averlo fatto da oltre tre anni. La motivazione più frequentemente addotta dalle donne intervistate per la mancata esecuzione dello screening è l'idea di non averne bisogno.

Il metodo di screening tradizionale per il carcinoma della cervice (che risale agli anni 50 ma che rimane pur sempre un valido metodo in quanto presenta un buon rapporto costo/efficacia) è l'esame citologico (il cosiddetto test di Papanicolau o Pap test).

Il metodo non è immune da errori (sia nelle lettura che nel campionamento con alta variabilità inter-operatore ed inter-laboratorio) e soprattutto non è un esame di tipo predittivo dell'evoluzione della patologia oltre ad avere una bassa specificità e sensibilità.

In conseguenza di ciò sono possibili risultati falsi negativi e falsi positivi che hanno forti ripercussioni sul paziente.

Alla luce di questa problematica, le recenti linee guida suggeriscono di introdurre come test di screening primario, accanto al tradizionale PAP test la ricerca del DNA virale.

Tuttavia, nonostante a livello nazionale siano stati raggiunti importanti livelli di adesione è, purtroppo, ancora elevato il numero di donne mai sottoposte ad un esame di screening.

Appare pertanto prioritario, nelle Regioni a basso tasso di risposta, attuare strategie per raggiungere le donne che non hanno mai eseguito un esame per la prevenzione di tale patologia in quanto, seppur rappresentino nel complesso una piccola percentuale della popolazione target, è tra queste che si annida il maggior rischio di sviluppare lesioni HPV-correlate di alto grado o francamente maligne.

Un'altra problematica emersa associata all'esame citologico è il prelievo del campione per l'analisi. Nei programmi di screening per la prevenzione del tumore della cervice uterina è raccomandato il prelievo di un campione cervicale effettuato da un medico. Tuttavia la visita ambulatoria può risultare un problema, in particolare per le donne che provengono da paesi dove alcune barriere socio-culturali e religiose limitano l'accesso alle visite ambulatoriali.

L'uso del test HPV su campioni di auto-prelievo (tampone vaginale o campione di urina), un campione non invasivo e facile da raccogliere, potrebbe essere più attraente per le donne perché non necessita una visita medica, nonché le implicazioni socio-culturali e religiose. Il campione di urine o il tampone vaginale per la ricerca di HPV potrebbe inoltre essere utile per l'arruolamento ai programmi di screening delle donne in gravidanza, come recentemente indicato dalle linee guida nazionali (GISCI).

Tuttavia, è fondamentale dimostrare l'accuratezza del risultato dell'HPV Test su campioni ottenuti tramite auto-prelievo. Il protocollo VALHUDES (59), recentemente condotto a livello internazionale per la validazione dei test HPV eseguiti su tamponi in auto-prelievi e su campioni di urina rispetto a quelli condotti su campioni prelevati da personale specializzato, ha dato riscontri altamente positivi su tali metodiche alternative di prelievo.

Sulla base di tali premesse, la presente tesi di Dottorato di Ricerca riporta i risultati più significativi ottenuti nel triennio formativo.

In particolare, la prima parte della presente tesi ha focalizzato l'attenzione sulla validazione clinica di nuove modalità di prelievo e trasporto dei campioni clinici, volti a migliorare i programmi di screening per la prevenzione del carcinoma cervicale,.

Nello specifico, ci siamo occupati di valutare l'accettabilità e l'accuratezza dell'HPV Test eseguito su differenti sistemi di auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®, HerSwab™, Evalyn®Brush) rispetto all'HPV Test eseguito su campione cervicale (gold standard).

I risultati dello studio, hanno dimostrato una “ottima” concordanza ($k = 0,95$) nel rilevamento della positività per HR-HPV, utilizzando il test commerciale AnyplexHPV28, tra auto-prelievo vaginale (FLOQSwabs®) e tampone cervicale effettuato dal clinico; “ottima” concordanza, seppur con valori leggermente inferiori ($k = 0,90$), nella comparazione tra auto-prelievo vaginale (HerSwab™) e tampone cervicale. La percentuale di positività al momento dell'arruolamento, ha mostrato che il 60% (12/20) delle donne presentava un'infezione da HR-HPV, per quanto riguarda il tampone cervicale, il 65% (13/20) ha evidenziato una positività con l'utilizzo del tampone di auto-prelievo vaginale FLOQSwabs®, e una positività da HR-HPV del 60% (12/20) al prelievo con il tampone HerSwab™. I genotipi HR-HPV maggiormente rilevati sono stati: HPV16, HPV31, HPV51, HPV56.

Prendendo in analisi il secondo gruppo di *devices* di auto-prelievo messi a confronto, abbiamo riscontrato anche in questo caso, un'“ottima” concordanza ($k = 0,95$) tra il campione cervicale e i campioni di auto-prelievo vaginale FLOQSwabs®, e un' “ottima” concordanza ($k = 0,80$) tra il campione cervicale e il tampone di auto-prelievo vaginale Evalyn®Brush.

Dai risultati ottenuti dall'analisi con il kit Anyplex™ II HPV28 Detection, abbiamo rilevato una positività ad HR-HPV del 55% (11/20), per quanto riguarda il tampone cervicale, il 50% (10/20) ha evidenziato una positività con l'utilizzo del tampone di auto-prelievo vaginale FLOQSwabs® e una positività da HR-HPV del 55% (11/20) al prelievo con il tampone Evalyn®Brush.

In questo caso, i genotipi HR-HPV, maggiormente riscontrati sono stati: HPV16, HPV35, HPV51, HPV56, in tutte e tre le tipologie di campione.

I genotipi più frequentemente riscontrati in tutte e tre le tipologie di auto-prelievo in confronto con il gold standard, sono stati l' HPV16, 31,35, 51 e 56, in accordo anche

con i recenti studi già pubblicati dal laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca (91,92) e confermati da precedenti osservazioni da parte del gruppo di ricerca della Sezione di Igiene del Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Sperimentali che avevano evidenziato come l' HPV 16 e HPV 51 siano tra i più frequenti, tanto da rappresentare una peculiarità epidemiologica della popolazione del Nord Sardegna (93).

L'elevata prevalenza dell'HPV16 è in linea con la sua diffusione a livello mondiale, non solo tra la popolazione femminile ma anche in quella maschile (94,95).

Per quanto concerne la ricerca dei principali patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmissibili (STIs), la percentuale di positività, per almeno uno dei microrganismi ricercati, rilevata è stata del: 35% (7/20) , 40% (8/20), 45% (9/20), rispettivamente per il tampone cervicale, FLOQSwabs® e HerSwab™.

Applicando ai risultati ottenuti il test di concordanza (K di Cohen) per la ricerca dei principali patogeni responsabili delle malattie sessualmente trasmesse (STIs), abbiamo ottenuto un'ottima" concordanza ($k = 0,90$), tra auto-prelievo vaginale (FloqSwab) e tampone cervicale effettuato dal clinico; e un'ottima" concordanza ($k = 0,90$) tra auto-prelievo vaginale (Herswab) e tampone cervicale. I patogeni rilevati in maggior misura sono stati *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis* in tutte e tre le tipologie di campioni.

I dati ottenuti, riguardanti il secondo gruppo di *devices* impiegati, per la ricerca dei principali patogeni responsabili delle malattie sessualmente trasmesse (STIs), hanno mostrato una "ottima" concordanza ($k = 0,90$) sia nel confronto tra il campione cervicale e l'auto-prelievo vaginale FLOQSwabs®, che con l'ulteriore auto-prelievo vaginale Evalyn®Brush.

Le percentuali di positività riscontrate sono state del: 35% (7/20), 45% (9/20), 45% (9/20), rispettivamente per il tampone cervicale, il tampone di auto-prelievo FLOQSwabs® e il tampone Evalyn®Brush.

Il patogeno principalmente rilevato è stato rappresentato dall' *Ureaplasma parvum*, UP, in tutte e tre le tipologie di campioni.

Tra i principali patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmissibili, abbiamo ottenuto un'elevata prevalenza dell'*Ureaplasma parvum*, come dimostrazione data da

diversi studi precedentemente pubblicati che hanno riportato una percentuale molto elevata di *Ureaplasma spp.* di infezione nel tratto genitale femminile.

Sebbene nella popolazione studiata non sia stata riscontrata un'associazione significativa tra le coinfezioni da hrHPV e altre malattie sessualmente trasmissibili, l'elevata prevalenza di malattie sessualmente trasmissibili riscontrate nelle donne positive all'hrHPV, a maggior rischio di sviluppare lesione precancerose, sottolineano la necessità di estendere nell'ambito dello screening organizzato anche la ricerca di tali patogeni che potrebbero favorire il decorso della lesione cervicali sostenuta dall'HPV in senso neoplastico. (92).

Per valutare il grado di accettabilità da parte delle pazienti sull'utilizzo dei dispositivi di auto-prelievo, nel complesso, per tutti e tre i dispositivi, sono stati esaminati i questionari di gradimento, riscontrando, in generale, un buon grado di soddisfazione. La quasi totalità delle pazienti ha giudicato semplici le operazioni di estrazione del tampone dalla custodia, il suo inserimento nella vagina e la rotazione per eseguire il prelievo (i giudizi riguardanti questi aspetti sono tutti collocati nelle categorie "molto facile" o "facile"). Soltanto una piccola percentuale delle pazienti (10%), ha riferito perdita di sangue durante il prelievo, effettuato con il tampone vaginale HerSwab™.

Le istruzioni fornite per l'esecuzione dell'auto-prelievo sono state giudicate chiare e comprensibili dalla totalità delle pazienti e l'intera procedura è stata giudicata facile con parere unanime. Complessivamente, la quasi totalità delle donne screenate ha dichiarato preferire l'utilizzo dei sistemi di auto-prelievo rispetto al prelievo classico effettuato dallo specialista, con una predilezione di dispositivo rivolta al tampone di auto-prelievo FLOQSwabs®.

Per quanto concerne i risultati riguardanti la seconda parte del progetto, inerente lo sviluppo di nuovi dispositivi diagnostici per l'analisi e l'identificazione qualitativa dei principali HR-HPVs, nel corso del mio triennio formativo, ho contribuito a sviluppare e testare su campioni biologici il prototipo del kit diagnostico molecolare OncoPredict, sviluppato dalla Ditta Hiantis.

Negli ultimi anni, la carica virale genotipo specifica di HPV per HR è stata proposta come marcatore surrogato dell'evoluzione dell'infezione da HPV; tuttavia, la letteratura

sulla correlazione tra carica virale e gravità della lesione è controversa, probabilmente a causa dell'assenza di metodi quantitativi standardizzati e validati a livello internazionale. Alcuni di questi sottolineano come la carica virale sia maggiore, in maniera statisticamente significativa, tra coloro che hanno lesioni e chi no (78; 79), senza peraltro correlarla ai vari gradi di lesione. Altri studi, invece, in maniera più specifica hanno evidenziato come la carica aumenti in misura direttamente proporzionale all'aumentare della lesione citologica (74;80; 81), non associandola però all'eventuale lesione istologica.

Altri ancora hanno focalizzato l'attenzione solo sulle lesioni istologiche, affermando che la carica aumenti in maniera significativa solo nei carcinomi (82) o nelle lesioni di alto grado CIN2+ (72). A tale proposito, uno dei principali aspetti ancora da chiarire è rappresentato dalla necessità di normalizzare il VL con la cellularità del campione (73; 72; 79; 83).

La normalizzazione della carica con un gene umano, per standardizzare le variazioni dovute alla cellularità del campione, è importante per un'accurata interpretazione dell'associazione tra carica e lesione (76), permettendo di calcolare la reale carica virale ed eliminando eventuali fluttuazioni dovute alle variazioni nel numero di cellule tra campioni diversi e tra intervalli di tempo diversi per campioni dello stesso paziente

Nella presente tesi è stato saggiato un nuovo kit molecolare HPV OncoPredict, rappresentato dalle due diverse linee di test: Screening e Typing, con i moduli SCR (screening) e QT 1/4 (che permette di rilevare tutti i genotipi HPV oncogenici) in campioni biologici e confrontato i risultati con quelli ottenuti utilizzando il kit commerciale marcato CE-IVD (Anyplex™ II HPV28-Seegene). I risultati hanno mostrato un ottimo accordo di positività tra i due sistemi diagnostici.

La valutazione comparativa dei risultati ottenuti tra i moduli OncoPredict-SCR e OncoPredict-QT 1/4 ha evidenziato un accordo di livello ottimale confermando come positivi (ed identificando anche lo specifico genotipo) i campioni già risultati positivi nel primo step (SCR).

Il modulo OncoPredict-SCR della prima linea di test ha consentito la selezione positiva dei campioni di HPV. Le percentuali totali di positività sono state del 65,1%, del 68,7% e del 66,3% rispettivamente per i campioni CCC e SV per FVU.

Analizzando la carica virale, il confronto tra i campioni prelevati con metodologia di auto-prelievo rispetto al gold standard (CCC) ha mostrato alcune differenze. In particolare, si è evidenziata discordanza nei valori di VL nel gold standard rispetto ai *devices* di auto-prelievo sia vaginale che di urina, aspetto verosimilmente determinato dalla presenza di cariche virali relativamente bassa.

In generale, le cariche virali genotipo specifiche nelle tre tipologie di campione mostrano un profilo molto simile, suggerendo che potrebbe essere possibile estendere la valutazione della carica virale, come nuovo biomarker, anche per ulteriori studi sull'auto-prelievo, indicando la necessità di utilizzare dei cut-off clinici differenti sia in base al genotipo virale che alla tipologia di campione.

Il genotipo HPV e la carica virale sono entrambi considerati utili biomarker, indipendenti. OncoPredict Kit, consente la combinazione di queste due determinazioni, rendendo possibile la valutazione della carica virale genotipo specifica.

6. CONSIDERAZIONI

Il Piano Nazionale di Prevenzione 2014-2018 aveva dato indicazione a tutte le regioni di introdurre, entro il 2018, il test HPV nelle procedure di screening cervicale quale metodica di primo livello in sostituzione della citologia convenzionale. Il test HPV, eseguito con test molecolari clinicamente validati e periodicamente aggiornati, è caratterizzato da consistenti evidenze scientifiche che ne evidenziano affidabilità e selettività. Tuttavia, solo in alcune Regioni è attualmente adottato come metodica di primo livello nello screening per la prevenzione del cervico-carcinoma.

Nella gran parte del territorio nazionale sta progressivamente e gradualmente sostituendo il Pap-test oppure è già utilizzato come criterio di triage nei casi di anomalie citologiche di basso livello.

Tuttavia, a parte la metodologia utilizzata, uno dei maggiori ostacoli nella realizzazione di efficienti programmi di prevenzione, è dato dall'assicurare una regolare partecipazione delle donne appartenenti alla fascia di età a maggior rischio (25 – 65 anni). L'obiettivo è quello di ridurre progressivamente il numero di donne che, adducendo differenti

motivazioni, non partecipa ai programmi di screening oppure aderisce soltanto occasionalmente.

Le principali cause per la mancata partecipazione sono attribuibili al difetto di informazione (“Penso di non averne bisogno”, “Nessuno me lo ha consigliato”), la scarsa predisposizione d’animo (“Pigrizia”) e la ridotta disponibilità di tempo (“Non ho avuto tempo” 10.9). Le quattro cause elencate potrebbero beneficiare della possibilità di aderire ai programmi di prevenzione attraverso dispositivi di auto-prelievo. Se a queste due ultime cause si aggiungono le quote determinate dal senso d’imbarazzo e dai timori, il possibile beneficio dell’auto-prelievo si accresce ulteriormente.

Ulteriore vantaggio è rappresentato dal possibile utilizzo dei sistemi di auto-prelievo nei confronti della popolazione femminile migrante in Italia. Aspetto particolarmente importante poiché il grande impatto dell’immigrazione verificatosi nell’ultimo decennio ha modificato i tratti della popolazione femminile italiana interessata dai programmi di prevenzione oncologica, introducendo variabili determinate da molteplici fattori culturali e dal differente grado di integrazione. I mutamenti che hanno accompagnato l’evolversi della situazione internazionale, hanno visto un progressivo incremento della presenza femminile all’interno dei flussi migratori, sino a raggiungere valori superiori al 50% degli immigrati presenti in Italia. Attualmente, si stima che le donne di origine straniera, appartenenti alla fascia d’età interessata dai programmi di screening cervicale, siano in Italia circa 1.450.000, valore che corrisponde a circa il 10% della popolazione femminile potenziale bersaglio di patologie neoplastiche cervicali. Il rilievo di queste evidenze, ha suggerito l’avvio di studi ed indagini volte a determinare quale sia il livello di coinvolgimento e di partecipazione allo screening nella popolazione femminile immigrata in Italia.

Uno di questi studi, basato sull’analisi trasversale dei dati raccolti dalle Indagini Multiscopo “Salute e ricorso ai servizi sanitari” 2005 e 2013 condotte dall’Istat, ha messo a confronto l’andamento della copertura di screening oncologico nelle donne italiane e nelle donne immigrate residenti in Italia (il criterio di riferimento prescelto, ha preso in considerazione donne con cittadinanza straniera e residenza in Italia). La sezione dello studio dedicata alle neoplasie cervicali, ha preso in esame i dati relativi a 32831 donne fra i 25 e i 64 anni. L’esame statistico dei dati disponibili ha valutato il livello di associazione fra un indicatore di efficacia della copertura (percentuale di donne che ha eseguito almeno un Pap test in assenza di sintomi nei tre anni precedenti l’intervista) in relazione ad alcuni fattori demografici, socioeconomici, abitudini di vita e possibilità di accedere ai servizi

sanitari. In sintesi, pur avendo osservato un miglioramento ponendo a confronto la situazione rilevata nel 2003 e la successiva indagine del 2015, lo studio ha evidenziato una condizione sfavorevole nell'accesso alla prevenzione oncologica delle donne immigrate, con una situazione eterogenea rispetto all'intero territorio nazionale

Le molteplici differenze culturali presenti fra le diverse etnie, i singoli costumi sociali, alcune motivazioni di ordine religioso, una spesso non agevole comprensione della lingua, rappresentano un insieme di cause che contribuisce a ridurre la partecipazione alle iniziative proposte in ambito preventivo.

L'introduzione di metodiche innovative di auto-prelievo, semplici da eseguire ed applicabili al proprio domicilio, offre una valida soluzione in grado di favorire il livello di adesione delle donne immigrate allo screening preventivo, aiutandole a superare in maniera semplice e discreta i possibili ostacoli legati alla propria cultura di origine.

In conclusione, in quasi tutti i contesti in cui è stato sperimentato, l'auto-prelievo è risultato efficace nell'aumentare la partecipazione, migliorando la copertura da test.

Oltre all'accettabilità della tecnologia da parte delle donne, anche quelle di solito difficili da raggiungere, altri elementi lo rendono un'alternativa valida: l'accuratezza clinica è simile a quella del test HPV su prelievi eseguiti da un operatore, rapporto costo–efficacia sostenibile con costi del dispositivo contenuti (sotto €1,20) e che la partecipazione delle donne che non abbiano eseguito di recente lo screening sia superiore al 30%.

Per quanto riguarda i protocolli di gestione delle donne positive al test, deve essere valutata la scelta di inviarle direttamente in colposcopia, oppure introdurre un test di triage, decisioni che dovranno essere prese in base alle condizioni organizzative locali.

Da ultimo, nell'ottica di migliorare l'efficacia della tecnologia, la ricerca scientifica dovrà tendere all'identificazione di test di triage che possano essere effettuati direttamente sul materiale raccolto tramite auto-prelievo.

In questo scenario, con lo scopo di individuare nuove modalità diagnostiche innovative, nel migliorare i programmi di screening per la prevenzione del carcinoma cervicale. Al fine di favorire di conseguenza la loro l'adesione, si inserisce la progettazione e lo sviluppo di un nuovo dispositivo diagnostico per l'analisi e l'identificazione qualitativa dei principali HR-HPVs.

Il kit OncoPredict è un saggio in vitro in Real-Time PCR, inserito all' interno di un progetto più ampio (HORIZON 2020 SME Instrument Project, SME Instrument Grant

GA 806551), sensibile, specifico e riproducibile; il suo obiettivo primario consiste nella valutazione delle performance in termini di sensibilità e specificità clinica sia dei campioni prelevati dal clinico che di auto-prelievo vaginale e di urina, nell'ambito dei programmi di screening e ai test di triage. Il kit offre la possibilità di caratterizzare la prevalenza e la carica virale genotipo-specifica degli HPV circolanti, al fine di ottenere il miglioramento della routine diagnostica dell'HPV.

In questi anni di Dottorato, grazie all'Università di Sassari, attraverso la borsa PON dei Dottorati di Ricerca a caratterizzazione industriale, ho potuto arricchire il mio bagaglio sia professionale che personale. Sono entrata in contatto con la realtà aziendale, un mondo interamente diverso, rispetto a quello conosciuto da tutti gli studenti universitari, una realtà dura ma altamente costruttiva.

Ringrazio tutti i partners con cui ho potuto collaborare nel corso di questi tre lunghi e intensi anni: dalla ditta Copan (Brescia); ditta GeneFirst (Abingdon, Oxford,UK); ditta Hiantis (Brescia) e dalla collaborazione del Dipartimento di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare dell'Università Milano-Bicocca (Monza).

In ordine temporale di collaborazione posso dire grazie a tutto il gruppo del Dipartimento di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare dell'Università Milano-Bicocca, alla ditta Copan, in particolare la mia tutor aziendale, la Dott.ssa Santina Castricciano, attraverso le loro esperienze e i loro progetti, sono entrata per la prima volta in contatto con le nuove strategie diagnostiche volte ad aumentare l'adesione delle donne ai programmi di screening.

La collaborazione con gli altri due partner progettuali, GeneFirst (Abingdon, Oxford, UK) e Hiantis (Brescia, Italia), ha permesso di poter relazionarmi con l'Estero e poter contribuire allo sviluppo di un nuovo prototipo di kit inserito all'interno di un progetto più ampio (HORIZON 2020 SME Instrument Project, SME Instrument Grant GA 806551) per migliorare la diagnosi precoce valutando nuovi biomarker di progressione, quali la carica virale.

7. BIBLIOGRAFIA

1. GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human Papillomaviruses. IARC, Lyon 1995 (updated 1997). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/volume64.pdf>.
3. Bosch F., Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55: 244-265.
4. Walboomers J. M. M. Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*; 182: 12-19.
5. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. (2008 Aug) 19;26 Suppl 10:K29-41. doi: 10.1016/j.vaccine. 2008.06.019.
6. Associazione Italiana di Oncologia Medica (2018) I numeri del cancro in Italia 2018. <http://www.aiom.it/fondazione-aiom/aiom-airtum-numeri-cancro-2018>.
7. AIRTUM Working Group. I tumori in Italia - Rapporto 2016. Sopravvivenza. *Epidemiol Prev* .2017; 41 (2): Suppl. 1.
8. AIRTUM Working Group. Italian cancer figures, Report 2014. Prevalenza e guarigione da tumore in Italia. Prevalence and cure of cancer in Italy. Italian cancer figures, Report 2014. Prevalence and cure of cancer in Italy. *Epidemiol Prev*. 2014; 38 (6 Suppl. 1):1-144.

9. ZurHausen H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers a brief historical account. *Virology*; 384 : 260–265.

10. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ.(2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The International perspective. *Int. J. Cancer*; 111: 278–285.

11. ZurHausen H, The search for infectious causes of human cancers: Where and why. 2009. *Virology* .392:1-10.

12. Munday J. Bovine and human papillomaviruses: A comparative review. 2014. *Vet Pathol* 51:1063-1075.

13. Calleja-Macias I.E, Halantari M, Allan B, Williamson A.L, Chung L.P, Collins R.J, Zuna R.E, Dunn S.T, Irtiz-Lopez R, Barrera-Saldaña H.A, Cubie H.A, Cuschieri K, Villa L.L, Bernard H.U (2005). Papillomavirus Subtypes Are Natural and Old Taxa: Phylogeny of Human Papillomavirus Types 44 and 55 and 68a and –b. *J Virol*; 79 (10): 6565-6569.

14. Costa R and Medeiros R, Bovine papillomavirus: Opening new trends for comparative pathology. 2014. *Arch Virol*.159:191198.

15. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999; 59:6132-6136.

16. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990; 21:1129-1136; Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16

together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 1989; 63:4417-4421.

17. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L, Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* 1991; 352 (6338): 824-7.

18. De Villiers E. M., Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zurHausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*;324(1):17-27.

19. Ho L., Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. (1991). Sequence Variants of Human Papillomavirus Type 16 in Clinical Samples Permit Verification and Extension of Epidemiological Studies and Construction of a Phylogenetic Tree. *J Clin Microbiol*; 29 (9): 1765-1772.

20. Muñoz N, Bosch FX, Silvia S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders JFP, Chris JLM. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl J Med.* 2003; 348: 518-527.

21. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H., & Doorbar, J. (2015). Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses*.16;7(7):3863-90. doi: 10.3390/v7072802.

22. Van Keer, S., Pattyn, J., Tjalma, W. A. A., Van Ostade, X., Ieven, M., Van Damme, P., & Vorsters, A. (2017). First-void urine: A potential biomarker source for triage of high-risk human papillomavirus infected women. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*.216:1-11. doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.06.036.

23. Stanley, M. A. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*, 130(3), 266–276.
24. Syrjänen K. J. (1997). Biological behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *New Developments in cervical Cancer Screening and Prevention. Blackwell Science*; 93-108.
25. Costa S. (2005). Gestione delle pazienti con pap test anormale. Vol. 1.
26. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N.; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. 287(16):2114-9. (2002). The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology.
27. [www.hpvunit.it/ cos'è lo screening](http://www.hpvunit.it/cos%27%3C%3E%20lo%20screening).
28. Fondazione GIMBE. Vaccino anti-HPV: prove di efficacia, profilo di sicurezza e copertura vaccinale in Italia. *Evidence* 2018; 10(7): e1000184.
29. D.M. Knipe P.M. Howley, *Fields Virology*, 6th ed., Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA, (2013).
30. P.S. Naud, C.M. Roteli-Martins, N.S. De Carvalho, J.C. Teixeira, P.C. de Borba, N. Sanchez, T. Zahaf, G. Catteau, B. Geeraerts, D. Descamps, Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination, *Hum. VaccinImmunother*. 10 (2014) 2147–2162.
31. E.A. Joura, A.R. Giuliano, O.E. Iversen, C. Bouchard, C. Mao, J. Mehlsen, E.D. Moreira Jr., Y. Ngan, L.K. Petersen, E. Lazcano-Ponce, P. Pitisuttithum, J.A.

Restrepo, G. Stuart, L. Woelber, Y.C. Yang, J. Cuzick, S.M. Garland, W. Huh, S.K. Kjaer, O.M. Bautista, I.S. Chan, J. Chen, R. Gesser, E. Moeller, M. Ritter, S. Vuocolo, A. Luxembourg, H. P. V. V. S. broad spectrum, a 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N. Engl. J. Med.* 372 (2015).

32. L.E. Markowitz, E.F. Dunne, M. Saraiya, H.W. Chesson, C.R. Curtis, J. Gee, J.A. Bocchini Jr., E.R. Unger, C. Centers for Disease, Prevention, Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *MMWR Recomm. Rep.* 63 (2014) 1–30.

33. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Brown DR, Ferenczy A, Harper DM, Koutsky LA, Kurman RJ, Lehtinen M, Malm C, Olsson SE, Ronnett BM, Skjeldestad FE, Steinwall M, Stoler MH, Wheeler CM, Taddeo FJ, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Marchese R, Esser MT, Bryan J, Jansen KU, Sings HL, Tamms GM, Saah AJ, Barr E. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006; 24 (27-28): 5571-83.

34. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 2007 May 10; 356 (19): 1928-43.

35. Stanley MA. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert Rev Vaccines.* 2003; 2(3):381-9.

36. www.salute.gov.it/imgs/c_17_pubblicazioni_774_allegato.pdf.

37. <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-agli-esami/hpv-test>.

38. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens- Part B: Biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10:331-332.
39. Ronco G, Dillner J, Elfström KM; the International HPV screening working group, et al. Efficacy of HPVbased screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 2014; 383: 524-32.
40. Winer R., Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. (2005). Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*;191 (5): 731–738.
41. Khan M. J., Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J NatlCancerInst.* 97(14):1072-9.
42. Anderson M.(1992). A text and atlas of integrated colposcopy. Chapman& Hall, London.
43. <https://www.epicentro.iss.it/passi/dati/ScreeningCervicale>.
44. <https://www.gisci.it/il-nuovo-programma-di-screening-con-il-test-hpv-sostituisce-il-pap-test>.
45. Ronco G, Biggeri A, Confortini M, et al. HTA report: Ricerca del DNA di papilloma virus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *EpidemiolPrev.* 2012;36 (3/4) suppl 1:1-72.

46. Von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Res.* 2015;1:22-31.
47. Giorgi Rossi P., Marsili LM, Camilloni L, Iossa A, Lattanzi A, Sani C, Di Pierro C, Grazzini G, Angeloni C, Capparucci P, Pellegrini A, Schiboni ML, Sperati A, Confortini M, Bellanova C, D'Addetta A, Mania E, Visioli CB, Sereno E, Carozzi F; Self-Sampling Study Working Group. (2011). The effect of self-sampled HPV testing on participation to cervical cancer screening in Italy: a randomised controlled trial. *BJC*; 104: 248-254.
48. Marlow LAV, Waller J, Wardle J. Barriers to cervical cancer screening among ethnic minority women: a qualitative study. *J Fam Plann Reprod Health Care* (2015) 41:248-54.
49. Mao C, Kulasingam SL, Whitham HK, Hawes SE, Lin J, Kiviat NB. Clinician and Patient Acceptability of Self-Collected Human Papillomavirus Testing for Cervical Cancer Screening. *J Womens Health* (Larchmt). 2017 Jun;26(6):609-615. doi: 10.1089/jwh.2016.5965. Epub 2017 Mar 23.
50. Bosgraaf RP, Ketelaars PJW, Verhoef VMJ, Massuger LFAG, Meijer CJLM, Melchers WJG, et al. Reasons for non-attendance to cervical screening and preferences for HPV self-sampling in Dutch women. *Prev Med* (2014) 64:108–13. doi:10.1016/j.ypmed.2014.04.011.
51. Eaker S, Adami HO, Sparén P, Reasons women do not attend screening for cervical cancer: a population-based study in Sweden. *Prev Med* (2001) 32:482–91. doi:10.1006/pmed.2001.0844.
52. Enerly E, Bonde J, Schee K, Pedersen H, Lönnberg S, Nygård M, Self-sampling for human papillomavirus testing among non-attenders increases attendance to the

Norwegian cervical cancer screening programme. *PLoS One* (2016) 11:e0151978. doi:10.1371/journal.pone.0151978.

53. Wikström I, Lindell M, Sanner K, Wilander E, Self-sampling and HPV testing or ordinary Pap-smear in women not regularly attending screening: a randomised study. *Br J Cancer*(2011) 105:337–9. doi:10.1038/bjc.2011.236.

54. Del Mistro A, Frayle H, Ferro A, Fantin G, Altobelli E, Giorgi Rossi P, Efficacy of self-sampling in promoting participation to cervical cancer screening also in subsequent round. *PrevMed Rep.* (2017 Mar); 5: 166–168.doi: 10.1016/j.pmedr.2016.12.017.

55. Verdoodt F, Jentschke M, Hillemanns P, Racey CS, Snijders PJ, Arbyn M (2015). Reaching women who do not participate in the regular cervical cancer screening programme by offering self-sampling kits: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer.* 51(16):2375-85. doi:10.1016/j.ejca.2015.07.006.

56. Giorgi Rossi P, Fortunato C, Barbarino P, Boveri S, Caroli S, Del Mistro A, et al. Self-sampling to increase participation in cervical cancer screening: an RCT comparing home mailing, distribution in pharmacies, and recall letter. *Br J Cancer* (2015) 112:667–75. doi:10.1038/bjc.2015.11.

57. Arbyn M, Verdoodt F, Snijders P. J. F, Verhoef V.M.J, EeroSuonio MD, Dillner L, PhD et al. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis January. 14, 2014.

58. Sellors J.W, Lorincz A.T, Mahony J.B, et al., Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *CMAJ* 163 (2000) 513–518.

59. VALHUDES: Arbyn M, Peetersa E, Benoyb I, Vanden Broeckb D, Bogersb J, De Sutterf P, Dondersg G, Tjalmaaj W, Weyersl S, Cuschierim K, Poljakn M, Bondeo J, Cocuzzao C, Zhaoq F. H, Van Keerr S, Vorstersr A. A protocol for validation of human papillomavirus assays and collections devices for HPV testing on self-samples and urine samples. 2018.
60. Arbyn, M., Anttila, A., Jordan, J., Ronco, G., Schenck, U., Segnan, N., ... von Karsa, L. (2010). European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition-summary document. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21(3), 448–458.
61. Meijer C. J. L. M., J. Berkhof, P.E. Castle, A. Hesselink, E.L. Franco, G Ronco, M. Arbyn, FX. Bosch, J. Cuzick, J. Dillner, D.A.M. Heideman, P.J.F. Snijders (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*; 124: 516–520.
62. https://www.hologic.com/sites/default/files/package-insert/15-305701_106_01.pdf
63. Poljak M. and Kocjan B. J. (2010). Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 8 (10): 1139-1162.
64. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf8/P080015c.pdf.
65. Poljak M., Fujs K, Seme K, Kocjan BJ, Vrtacnik-Bokal E. (2005). Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human Papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatoven APA*; 14 (4).
66. <http://www.arrowdiagnostics.it/download/microbiologia/papillomavirus/Anyplex-II-HPV-HR-Detection.pdf>.

67. Abreu A. L. P., Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*;6: 9: 262.
68. Clad A., Reuschenbach M, Weinschenk J, Grote R, Rahmsdorf J, Freudenberg N. (2011). Performance of the Aptima High-Risk Human Papillomavirus mRNA Assay in a Referral Population in Comparison with Hybrid Capture 2 and Cytology. *J ClinMicrobiol*; 49 (3): 1071-1076.
69. Ratnam S., Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. (2011). Aptima HPV E6/E7 mRNA Test is as Sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but More Specific at Detecting Cervical Precancer and Cancer. *J ClinMicrobiol*; 49 (2): 557-564.
70. Manawapat A., Stubenrauch F, Russ R, Munk C, Kjaer SK, Iftner T. (2012). Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res*; 2 (2): 192-203.
71. Schmitt M., Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, Pawlita M; VALGENT Study Group.(2013). Multiple Human Papillomavirus Infections with High Viral Loads Are Associated with Cervical Lesions but Do Not Differentiate Grades of Cervical Abnormalities. *JCM*; 51 (5): 1458-1564.
72. Flores Y.N., Bishai DM, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Lörincz A, Hernández M, Ferris D, Salmerón J. (2008). Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud pública de México*; 50 (1):49-58.
73. Bigras G. and de Marval F. (2005). The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13842 women. *Brit J Cancer*; 93: 575-581.

74. Gravitt P. E., Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti MC, Rodriguez AC, Helzlsouer KJ, Schiffman M. (2003). A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 128(6) 477-484.
75. Flores-Munguia R., Siegel E, Klimecki WT, Giuliano AR. (2004). Performance Assessment of Eight High-Throughput PCR Assays for Viral Load Quantitation of Oncogenic HPV Types. *J Mol Diagn*; 6 (2):115-124.
76. Cheung J. L. K., Cheung TH, Ng CW, Yu MY, Wong MC, Siu SS, Yim SF, Chan PK. (2009). Analysis of Human Papillomavirus Type 18 Load and Integration Status from Low-Grade Cervical Lesion to Invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol*; 47 (2): 287-293.
77. Cheung J. L. K., Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. (2006). Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. *J Infect Dis*; 194: 1706-1712.
78. Xi L. F., Hughes JP, Castle PE, Edelstein ZR, Wang C, Galloway DA, Koutsky LA, Kiviat NB, Schiffman M. (2011). Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case-control Study. *J Infect Dis*; 203: 1425-1433.
79. Kovacic M. B., Castle PE, Herrero R, Schiffman M, Sherman ME, Wacholder S, Rodriguez AC, Hutchinson ML, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Burk RD. (2006). Relationships of Human Papillomavirus Type, Qualitative Viral Load, and Age with Cytologic Abnormality. *Cancer Res*; 66: (20): 10112-10119.
80. Saunier M., Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwarz E, Mouglin C, Pr etet JL. (2008). Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol*; 46 (11): 3678-3685.

81. Tabora N., Ferrera A, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. (2008). High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. *Am J TropMedHyg*; 78(5): 843–846.
82. Boulet G.A.V., Benoy IH, Depuydt CE, Horvath CA, Aerts M, Hens N, Vereecken AJ, Bogers JJ. (2009). Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a Liquid-Based Cytology Setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 18(11): 2992-2999.
83. Tsai H.T., Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY, Wu TN, Lin LJ, Ho CK, Liu HW, WuMT.(2005). Association between Quantitative High-Risk Human Papillomavirus DNA Load and Cervical Intraepithelial Neoplasm Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14(11 Pt 1):2544-2549.
84. Schlecht N.F., Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. (2003). Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*; 10;103(4): 519–524.
85. Roberts I., Ng G, Foster N, Stanley M, Herdman MT, Pett MR, Teschendorff A, Coleman N. (2008). Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. *BMC Biotechnology*, 24;8:57.
86. Xu Y., Dotto J, Hui Y, Lawton K, Schofield K, Hui P. (2009). High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia and Viral Load of High-Risk Human Papillomavirus: Significant Correlations in Patients of 22 Years Old or Younger. *Int J Clin Exp Pathol*; (2)2: 169-175.
87. Constandinou-Williams C., Collins SI, Roberts S, Young LS, Woodman CB, Murray PG. (2010). Is Human Papillomavirus Viral Load a Clinically Useful Predictive Marker? A Longitudinal Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 19(3): 832-837.

88. Swan D. C., Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP. (1999). Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *J Clin Microbiol*; 37 (4): 1030-1034.
89. Ramanakumar A.V., Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL. (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infectious Diseases*; 11;10: 326.
90. Van Keer S, Tjalma WAA, Pattyn J, Biesmans S, Pieters Z, Van Ostade X, Ieven M, Van Damme P, Vorsters A (2018). Human papillomavirus genotype and viral load agreement between paired first-void urine and clinician-collected cervical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. doi:10.1007/s10096-017-3179-1.
91. Cocuzza CE, Martinelli M, Sina F, Piana A, Sotgiu G, Dell'Anna T, Musumeci R. Human papillomavirus (2017). DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia., *PLOS ONE* 12(11): e0188592.
92. Martinelli M, Musumeci R, Sechi I, Sotgiu G, Piana A, Perdoni F, Sina F, Fruscio R, Landoni F. Cocuzza CE (2019). Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) and Other Sexually Transmitted Infections (STIs) among Italian Women Referred for a Colposcopy. *Int J Environ Res Public Health*. Dec 9;16(24).
93. Piana A, Sotgiu G, Cocuzza C, Musumeci R, Marras V, Pischedda S, Deidda S, Muresu E, Castiglia P. (2013). High HPV-51 prevalence in invasive cervical cancers: Results of a pre-immunization survey in North Sardinia, Italy. *PLoS ONE*. 8, e63395.

94. Tota J.E, Ramanakumar A.V, Jiang M, Dillner, J, Walter S.D, Kaufman J.S, Coutlée, F, Villa L.L, Franco E.L (2013). Epidemiologic approaches to evaluating the potential for human papillomavirus type replacement post vaccination. *Am. J. Epidemiol.* 178, 625–634.
95. Bianchi S, Frati E.R, Panatto D, Martinelli M, Amicizia D, Zotti C.M, Martinese M, Bonanni P, Boccalini S, Coppola R.C, et al (2013). Detection and genotyping of human papillomavirus in urine samples from un vaccinated male and female adolescents in Italy. *PLoS ONE.* 8, e79719.
96. Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H (2012). Frequency of Chlamydia trachomatis in Ureaplasma-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect. Dis.* 12, 82.
97. Del Prete R, Ronga L, Lestingi M, Addati G, Angelotti U.F, Di Carlo, D, Miragliotta, G (2017). Simultaneous detection and identification of STI pathogens by multiplex Real-Time PCR in genital tract specimens in a selected area of Apulia, a region of Southern Italy. *Infection.* 45, 469–477.
98. Leli C, Mencacci A, Latino M.A, Clerici P, Rassu M, Perito S, Castronari R, Pistoni E, Luciano E, DeMaria D, et al (2018). Prevalence of cervical colonization by Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium in childbearing aged women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51, 220–225.
99. Lukic A, Canzio C, Patella A, Giovagnoli M, Cipriani P, Frega A, Moscarini M (2006). Determination of cervico vaginal microorganisms in women with abnormal cervical cytology: The role of Ureaplasma urealyticum. *Anticancer Res.* 26, 4843–4849.

100. Parthenis C, Panagopoulos P, Margari N, Kottaridi C, Spathis A, Pouliakis A, Konstantoudakis S, Chrelias G, Chrelias C, Papantoniou N, et al (2018). The association between sexually transmitted infections, human papillomavirus, and cervical cytology abnormalities among women in Greece. *Int. J. Infect. Dis.*73, 72–77.

101. Biernat-Sudolska, M.; Szostek, S.; Rojek-Zakrzewska, D.; Klimek, M.; Kosz-Vnenchak, M (2011). Concomitant infections with human papillomavirus and various mycoplasma and ureaplasma species in women with abnormal cervical cytology. *Adv. Med. Sci.*56, 299–303.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del
Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005),
Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 "Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale"



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo

