



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
INDIRIZZO IN SANITÀ PUBBLICA ED EVIDENCE BASED PREVENTION
XXII CICLO

ISTITUTO DI IGIENE E MEDICINA PREVENTIVA
(Direttore: Prof.^{ssa} Elena Muresu)

STUDIO CROSS-SECTIONAL DELL'INFEZIONE DA PAPPILLOMA
VIRUS (HPV) E DEL CARCINOMA DELLA CERVICIA UTERINA
NELLA POPOLAZIONE DEL NORD-SARDEGNA

Tutore:

Dott. MARCO DETTORI

Dottorando

Dott.ssa Grazia Zidda

Anno Accademico 2008/2009

INDICE GENERALE

1. PREMESSE	pag 4
1.1 Patologia associata all'infezione da HPV	pag 5
1.2 Classificazione epidemiologica dei genotipi oncogeni di HPV	pag 8
1.3 Classificazione delle lesioni precancerose	pag 11
1.4 Diagnosi	pag 14
1.5 Il Pap Test o test di Papanicolaou	pag 15
1.6 Significato clinico degli HPV-DNA test	pag 17
1.7 Carica virale e stato clinico	pag 19
1.8 Vaccinazione anti HPV	pag 20
2. SCOPO DELL'INDAGINE	pag 24
3. MATERIALI E METODI	pag 29
3.1 Analisi molecolare secondo il protocollo INNO Lipa Genotyping Extra	pag 32
3.2 Real-Time PCR	pag 36
4. RISULTATI	pag 39
5. DISCUSSIONE	pag 45
6. BIBLIOGRAFIA	pag 50

ABSTRACT

Hygiene and Preventive Medicine Institute,

University of Sassari, Italy

gzidda@uniss.it

Aim: Within the research project about the cervical infection epidemiology caused by Papillomavirus in Northern Sardinia, a cross-sectional study was performed to define the prevalence value and moreover genotypes' diffusion among the geographical area.

Methods: 340 women were subjected to pap tests at the Gynaecological Clinic of the University of Sassari and specialist clinics. Biological samples were sent at the Institute of Pathological Anatomy for the cytological analysis and at the Institute of Hygiene and Medicine Prevention to research viral DNA with molecular test (INNO-LiPA) and the home made Real Time PCR set-up during the first phase of the project.

Results: the sample examined was 96% of Italian nationality, most with a higher education degree (50%); 58% has performed the cytology in the last three years. The prevalence of infection was 35,3%, which decreases linearly in the advanced age groups. Between high-risk genotypes (75,8%), HPV16 (55%), HPV51 (36,6%) and HPV18 (5,0%) were the most frequent; among those at low risk HPV6 (45,5%), HPV11 (21,2%) and HPV40 (2,5%). The co-infections have been frequent (17,5%), mainly incurred by HPV genotypes 16 and 51 (57,1%).

Conclusions: The HPV infection prevalence values are similar those reported in studies conducted in other geographical areas. Even in northern Sardinia genotype HPV16 is the most frequent, however is necessary to implement the number of samples to verify the high presence of genotype HPV51 and the lower circulation of genotype HPV18.

1. PREMESSE

Il carcinoma della cervice uterina è il primo tumore riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile a un'infezione²². Rappresenta, a livello mondiale, il secondo tumore maligno più diffuso tra le donne al di sotto dei 50 anni, dopo il cancro al seno, ed è la quinta causa di decessi per tumore nelle donne^{44,45}. Attualmente in Europa si registrano circa 65 mila nuovi casi ogni anno, con 28 mila decessi, mentre in Italia si stima che ci siano 3500 nuovi casi all'anno e oltre 1500 decessi.^{44,45}

L'agente eziologico del carcinoma cervicale è il *papillomavirus umano*, ampiamente diffuso nella popolazione, che infetta sia uomini che donne^{2,32}. Si stima che oltre il 75% delle donne contragga un'infezione genitale da HPV (*Human Papilloma Virus*) nel corso della propria vita¹¹, ma solo in una minoranza dei casi

essa risulta persistente e può condurre allo sviluppo di un tumore¹²

Esistono, peraltro, rilevanti differenze geografiche di incidenza del carcinoma cervicale, legate soprattutto alla diversa diffusione di programmi di screening organizzati per la sua prevenzione. Infatti, nelle nazioni che hanno avviato programmi di screening organizzati basati sull'offerta dell'esame citologico Pap Test (ancora oggi il metodo di screening di riferimento) alle donne di età compresa tra i 25 ed i 64 anni, si è assistito nelle ultime decadi ad un importante decremento dell'incidenza di questa neoplasia²⁹.

1.1 Patologia associata all'infezione da HPV

Le donne possono contrarre l'infezione da HPV entro pochi anni dall'inizio della loro attività sessuale⁸ e l'infezione è causa di lesioni transitorie e clinicamente irrilevanti, che nella maggior parte dei casi si risolvono spontaneamente senza conseguenze

patologiche e con cambiamenti citologici temporanei (displasie o neoplasie intraepiteliali cervicali di grado I)^{10,19}. Soltanto una bassa percentuale di donne, in seguito ad un'infezione primaria mantiene un'infezione persistente^{24,47} (circa il 10% dopo 5 anni), con un aumentato rischio (più del 50%) di sviluppare lesioni precancerose²³; sono poi molto diffuse anche le infezioni multiple e sequenziali con differenti tipi oncogeni di HPV^{56,18} (Fig. 1).

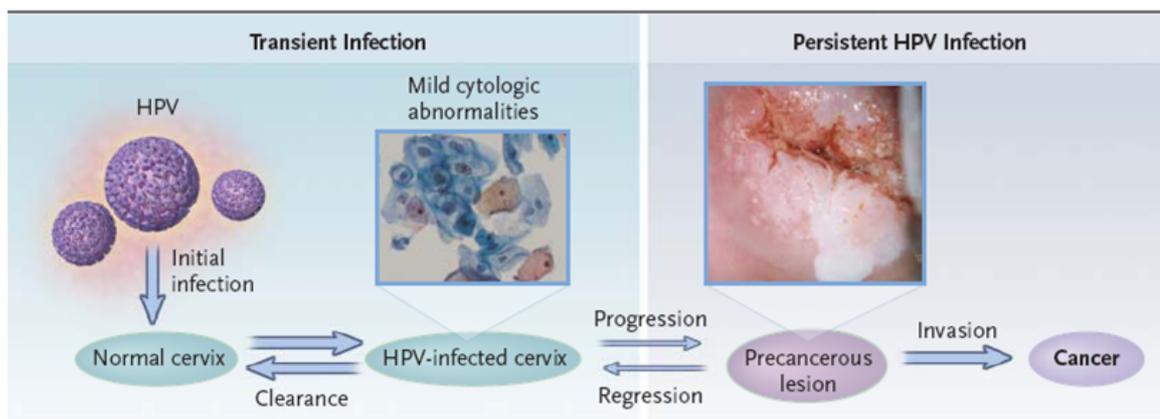


Fig. 1 : Storia naturale della carcinogenesi della cervice uterina.

L'acquisizione di un genotipo virale ad alto rischio aumenta la probabilità di infezione persistente⁶; in questo caso si possono sviluppare lesioni precancerose che possono poi progredire fino al cancro della cervice¹⁷. L'aberrante espressione degli oncogeni

virali può quindi predisporre allo sviluppo del cancro cervicale, condizione necessaria ma in realtà non sufficiente, provata anche dal fatto che le proteine virali non riescono da sole a trasformare i cheratinociti umani in coltura^{60,53,16}.

Si ritiene che la oncogenesi mediata da HPV sia determinata anche dalla presenza di fattori di rischio che concorrono con l'infezione virale; ad esempio, l'elevato numero di partner sessuali, il fumo di sigaretta, l'uso a lungo termine di contraccettivi orali^{5,50} e la coinfezione con altre infezioni sessualmente trasmesse quali *Chlamydia trachomatis* ed virus dell'*Herpes simplex* (di tipo 1,2)^{26,4}.

Generalmente il tempo che intercorre tra l'infezione e l'insorgenza delle lesioni precancerose è di circa cinque anni, mentre la latenza per l'insorgenza del carcinoma cervicale può essere di decenni. Per questo motivo, la prevenzione del carcinoma è basata su programmi di screening, che consentono di

identificare le lesioni precancerose e di intervenire prima che evolvano^{27,37,46}.

1.2 Classificazione epidemiologica dei genotipi oncogeni di HPV.

Evidenze epidemiologiche molecolari indicano chiaramente che alcuni tipi di HPV sono la principale causa del cancro invasivo della cervice uterina⁴⁰ e degli stadi pre-neoplastici. Dai risultati tratti da 11 studi caso-controllo⁴¹ in cui sono stati analizzati campioni cervicali di pazienti con cancro della cervice uterina provenienti da 9 paesi diversi, mediante PCR con primers consensus (GP5+/GP6+ e MY009/MY11), è emerso che il DNA di almeno un genotipo di HPV è presente nel 91.9 % delle donne affette da cancro e soltanto nel 13.4 % nel gruppo di controllo.

L'analisi filogenetica dei papillomavirus umani ed animali ha permesso di distinguere 16 generi identificati con le lettere dell'alfabeto greco ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta, \theta, \iota, \kappa, \lambda, \mu, \nu, \chi, \omicron, \pi$).

I papillomavirus umani afferiscono ai generi α (prevalentemente mucosali) e β (cutanei).

E' stata dimostrata una stretta correlazione filogenetica fra HPV 6 e 11, genotipi responsabili del 90% delle lesioni condilomatose. Fra quelli di tipo "mucosale", HPV 16 fa parte di un cluster filogenetico ($\alpha 9$) che include anche i genotipi 33, 31, 58, 52 e 35; HPV 18 fa parte della clade $\alpha 7$ che comprende anche i genotipi 45, 59, 39 e 68³⁸. Questa vicinanza filogenetica è probabilmente alla base di una possibile reattività immunologica crociata fra genotipi diversi²⁰.

15 genotipi sono stati classificati come "high risk" (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82), 3 come probabile "high risk" e 12 come "low risk" (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, and CP6108) (Tab. 1).

Classificazione filogenetica HPV	Classificazione epidemiologica HPV	
	High risk	Low risk

High risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26,*53, *66	70
Low risk	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

Tab. 1: Classificazione filogenetica ed epidemiologica dei vari genotipi di HPV.

Da studi epidemiologici emerge che il genotipo 16 è il più frequente (53-68%) tra quelli identificati nei vari paesi⁴⁶; a seguire il genotipo 18 (3-26%). Come evidenziato dalla figura 2 esistono, oltre ai ben noti 6 genotipi "high risk" più frequenti, altri meno frequenti (5-17%).

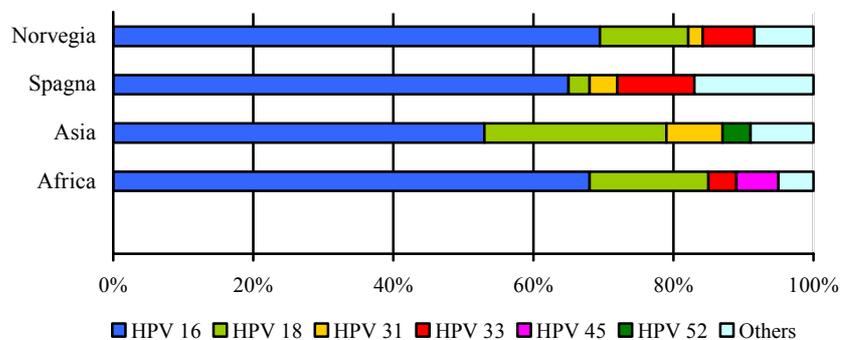


Fig. 2 :Distribuzione dei genotipi maligni di HPV nei vari Paesi.

1.3 Classificazione delle lesioni precancerose

I papillomavirus umani sono abitualmente distinti in genotipi cutanei o mucosi, in relazione alla localizzazione delle lesioni in cui solitamente si rilevano⁹ (Tab. 2).

Il carcinoma cervicale invasivo è preceduto da lesioni che sono caratterizzate da disturbi di maturazione cellulare, stratificazione e atipia nucleare e possono essere classificate istologicamente come neoplasia intraepiteliale cervicale (CIN) o lesioni intraepiteliali a cellule squamose secondo la terminologia di Bethesda^{22,51,55}.

<u>Lesione</u>	<u>Genotipo di HPV</u>
<u>Cute:</u> Verruca volgare, verruca piana e palmare. Epidermodisplasia verruciforme	1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 41 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 47, 49

<u>Mucosa:</u>	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55
Condilomi acuminati e piani	6, 11 6, 11
Condiloma gigante	
Papillomi laringe e vie respiratorie	
Lesioni orali (iperplasia focale, papillomi)	2, 11, 13, 32
CIN, Carcinoma della cervice uterina, carcinoma della vulva	Alto rischio: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 Probabile alto rischio: 26, 53 e 66 Basso rischio: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108

Tab.2 : Genotipi di HPV associati alle differenti patologie.

La classificazione secondo il sistema Bethesda è una classificazione citologica dicotomica che indica le lesioni con il termine di Lesioni Intraepiteliali Squamose (*Squamous Intraepithelial Lesion, SIL*), suddivise in lesioni a basso grado (Low SIL) che corrispondono a CIN1 (Cervical Intraepithelial Neoplasm) della classificazione di Ralph Richart, e lesioni ad alto grado (High SIL), che includono CIN2 e CIN3 (Tab. 3).

Nel 1988 il sistema Bethesda prevedeva la categoria ASCUS, "cellule squamose atipiche di significato indeterminato", per designare anomalie cellulari non sufficienti a supportare la diagnosi di "lesione squamosa intraepiteliale"³¹.

Altra categoria compresa nel Sistema è AGUS, "cellule ghiandolari atipiche di significato indeterminato", sostituita col termine AGC (cellule ghiandolari atipiche), per evitare confusione con ASCUS.

classificazione	origine epiteliale	origine ghiandolare
Norway (Richard, 1967)	HPV/Condiloma CIN 1: Neoplasia cervicale intraepiteliale (displasia lieve) CIN 2: Neoplasia cervicale intraepiteliale (displasia moderata) CIN 3: Neoplasia cervicale intraepiteliale (displasia grave)	
Bethesda System (1991)	ASCUS: Cellule squamose atipiche di significato indeterminato LOW-SIL: Lesione intraepiteliale squamosa di basso grado (HPV-CIN 1)	AGUS: Cellule ghiandolari atipiche di significato indeterminato

	HIGH-SIL: Lesione intraepiteliale squamosadi alto grado (CIN2-3)	
--	--	--

Tab. 3 :Terminologia delle lesioni cervicali pre-cancerose.

1.4 Diagnosi

Uno degli aspetti di maggior interesse nella clinica del cancro del collo dell'utero è legato alla possibilità di arrivare, con una facilità che non trova riscontro per nessun altro tumore, alla diagnosi precoce, individuando la neoplasia quando ancora non ha iniziato ad invadere il connettivo sottoepiteliale e non ha dato manifestazioni cliniche.

La citologia cervicale e la colposcopia hanno infatti permesso una più approfondita conoscenza consentendo peraltro una corretta diagnosi, l'individuazione e l'esatta localizzazione topografica della lesione.

1.5 Il Pap Test o Test di Papanicolaou

Il Pap Test (Fig. 3) è un test di screening in vigore già dagli anni 40, la cui funzione principale è quella di individuare nella popolazione femminile donne a rischio di sviluppare il carcinoma della cervice uterina. Inoltre, il Pap Test può dare utili indicazioni sull'equilibrio ormonale della donna e permettere il riconoscimento di infezioni batteriche, virali o micotiche^{42,35}.

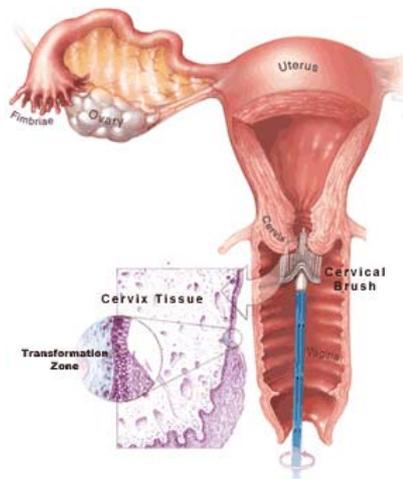


Fig. 3 : Modalità di esecuzione del prelievo.

Papanicolaou pubblicò una classificazione costituita da 5 classi (Tab. 4):

CLASSI SECONDO PAPANICOLAOU	
Classe I	Pap Test negativo: assenza di cellule atipiche
Classe II	Pap Test negativo: presenza di cellule con alterazioni dovute di solito a fatti flogistici ma senza caratteri di discariosi (alterazioni del nucleo)
Classe III	Pap Test dubbio: presenza di qualche cellula alterata, ma con caratteristiche insufficienti a sospettarne la malignità. Coesistenza con flogosi di <i>Trichomonas</i> o di infezioni virali (HPV- HSV-2)
Classe IV	Pap Test positivo: presenza di pochi elementi nettamente displasici, cioè con discariosi e con anomalie citoplasmatiche, c'è il fondato sospetto di lesione cancerosa iniziale.
Classe V	Pap Test positivo: presenza di numerosi elementi displasici, presenza di lesione maligna quasi certa.

Tab. 4: Classi secondo Papanicolaou.

I vantaggi di questo test sono notevoli. Innanzitutto è un esame accettabile dalla donna, in quanto il grado di invasività è minimo, essendo fatto in una zona particolarmente accessibile (la cervice uterina è un organo comunicante con l'esterno e quindi di facile accesso), esso inoltre presenta dei costi contenuti.

Il Pap-test non è però un esame diagnostico, ma è un test di screening capace di individuare le donne sospette portatrici di una neoplasia iniziale del collo uterino e rappresenta un campanello

d'allarme che comporta ulteriori indagini. Una paziente con un Pap Test positivo o dubbio deve essere sottoposta all'esame colposcopico.

Nel prossimo futuro, il ruolo di quest'esame nella prevenzione dei tumori del collo uterino è sicuramente destinato a cambiare. La scoperta che la maggior parte di tali tumori sono dovuti all'HPV, ha portato allo sviluppo di tecniche biomolecolari diagnostiche caratterizzate da una sensibilità elevata (superiore al 95%), che ne ha fatto prospettare l'utilizzazione come metodica di screening.

1.6 Significato clinico degli HPV-DNA test

Lo sviluppo di saggi di rilevamento del DNA altamente sensibili ha rivoluzionato la diagnosi dell'HPV e ha permesso di studiare molteplici aspetti dell'infezione da HPV.

Oggi le infezioni da HPV sono monitorate principalmente mediante gli HPV-DNA test⁵⁹, ovvero tramite determinazioni

squisitamente qualitative che non permettono, tuttavia, di distinguere tra infezione transiente e persistente. Quindi, è chiaro che per identificare le donne con un incrementato rischio di neoplasia, il solo rilevamento del HPV-DNA è insufficiente, pertanto deve essere sviluppato un nuovo algoritmo che combini lo screening citologico con l'analisi degli acidi nucleici virali, al fine di ottimizzare il valore predittivo positivo e negativo per lo sviluppo della patologia^{53, 43}.

Ancor più recentemente, è stato segnalato che la persistenza di HPV potrebbe rappresentare un importante fattore di rischio, così come la valutazione dell'attività replicativa virale. A tale proposito sono stati proposti due marker surrogati: la carica virale^{36,43, 60} e i trascritti oncogeni E6/E7.

1.7 Carica virale e stato clinico

In questi ultimi anni sono stati sviluppati numerosi saggi di Real-time PCR per la quantificazione di genotipi maligni di HPV da campioni della cervice uterina. Sebbene la maggior parte degli studi associno la progressione delle lesioni precancerose e l'elevato rischio di carcinoma della cervice con l'aumento della carica virale dei genotipi di HPV "high risk", altri sembrano non confermare questi dati^{21,57}. L'incongruità dei risultati potrebbe essere associata alle diverse metodiche utilizzate e quindi alla scelta dei target e quindi alle diverse forme di DNA amplificato (episomale o integrato) o più semplicemente al diverso modo di esprimere le cariche virali (valori normalizzati o valori assoluti)^{28, 30}. Quindi è ancora da chiarire il significato clinico di questo marker. Infine rimane ancora da stabilire quali siano i "threshold" dei "viral load" per ciascun genotipo maligno di HPV che permetta

di distinguere un'infezione transiente da un'infezione persistente attiva.

1.8 Vaccinazione anti HPV

È noto che nell'evoluzione dell'infezione da HPV un ruolo fondamentale venga svolto dalla risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata.

Le infezioni pregresse da HPV non inducono necessariamente immunità verso infezioni successive, ma si ritiene che la risposta immunitaria umorale, ed in particolare gli anticorpi diretti verso L1, abbiano la proprietà di prevenire l'ancoraggio e l'ingresso del virus nella cellula. Al contempo, l'immunità cellulo-mediata è importante per eliminare la maggior parte delle infezioni naturali⁵⁴.

La vaccinazione previene l'infezione mediante l'induzione di anticorpi neutralizzanti che si legano a siti presenti sul capsido e

prevengono l'infezione della cellula ospite. Con la vaccino profilassi si stimola la produzione di elevati livelli di anticorpi neutralizzanti serici, una quota dei quali dovrà essere disponibile a livello cervico-vaginale (per trasudazione o essudazione) per prevenire e bloccare nuove infezioni. Infatti la disponibilità di elevati titoli anticorpali neutralizzanti a livello della mucosa cervicale al momento dell'esposizione al virus rappresenta la migliore garanzia di protezione. Un ruolo importante è svolto anche dalla risposta immunitaria cellulo-mediata, avente la funzione di supportare la produzione anticorpale e di favorire la clearance dell'infezione⁷.

Esistono oggi sul mercato due vaccini, il Cervarix (bivalente) ed il Gardasil (tetraivalente) per la prevenzione primaria delle infezioni da HPV e delle forme tumorali correlate. Studi clinici controllati dimostrano che in una popolazione di donne non esposte in passato all'infezione da HPV le stime di efficacia sono pressoché pari al 100% per entrambi i prodotti, mentre da una

recente revisione sistematica della letteratura con meta-analisi che considera l'insieme delle popolazioni studiate negli studi clinici controllati, si è evidenziato che i due vaccini hanno un'efficacia del 89-87% nella riduzione delle infezioni persistenti da HPV¹⁻⁴⁸.

Sulla base di importanti evidenze scientifiche ed epidemiologiche è possibile, inoltre, affermare che i vaccini Cervarix e Gardasil hanno la capacità di indurre una cross-protezione contro HPV 31, 33, 52, 58 e che il solo Cervarix è in grado di dare cross-protezione contro HPV 45. Essendo filogeneticamente correlati, i genotipi di HPV, appartenenti alle specie alpha (HPV 5, HPV 6, HPV 7, HPV 9, HPV 11) ad alto rischio oncogeno, condividono gli epitopi del capsido, i quali possono pertanto elicitare una risposta immune cross-reattiva. Da numerosi studi condotti, si evince che il confronto tra la cross-protezione indotta dal vaccino quadrivalente Gardasil e quella indotta dal vaccino bivalente Cervarix evidenzia un'efficacia verso

gli altri ceppi virali oncogeni abbastanza simile, eccezion fatta per la cross-protezione contro HPV 45 e 58. Infatti il solo Cervarix è capace di indurre cross-protezione nei confronti di questi ceppi.

Questi dati sono di fondamentale importanza tenuto conto del fatto che i ceppi HPV 16 e 18 sono responsabili di circa il 70% dei cervicocarcinomi nel mondo³⁹; i ceppi HPV 45 e 31 sono associati ad un altro 10% circa di tumori della cervice; i ceppi HPV 33 e 52 contribuiscono per un altro 5-7%.

Inoltre HPV 18, 45 e 16 sono presenti in più del 90% di adenocarcinomi endocervicali. Risulta, pertanto, determinante il ruolo della cross-protezione indotta dal vaccino Cervarix non solo nei confronti di HPV 31, 33, 52 (così come evidenziato per Gardasil), ma anche nei confronti di HPV 45.

Per quel che concerne la Regione Sardegna, la strategia vaccinale recentemente adottata prevede l'offerta attiva e gratuita a tutte le adolescenti di età compresa fra gli undici anni

compiuti ed i dodici, ed è assicurata, attraverso una forma di compartecipazione al costo da parte della famiglia, a tutte le ragazze fino ai 18 anni. Tale strategia consentirà di ottenere una riduzione del 61% sia dell'incidenza del carcinoma della cervice uterina che della mortalità ad esso associata.

2. SCOPO DELL'INDAGINE

Il legame eziologico tra tumore cervicale ed infezioni da papillomavirus umano ha stimolato un forte interesse nello sviluppo di nuovi test diagnostici, da impiegare per lo screening o per studi di tipo epidemiologico.

Peraltro, la recente introduzione in Italia di nuovi vaccini anti-HPV impone nuove e più accurate conoscenze sulla reale diffusione dell'infezione in relazione sia ai gruppi di età

maggiormente coinvolti, sia ai genotipi virali circolanti nei diversi territori italiani.

Ad oggi, non è stato ancora condotto in Italia uno studio di popolazione su vasta scala per valutare la prevalenza dell'infezione cervicale da HPV e conoscere i genotipi virali a maggiore diffusione.

Peraltro, il ruolo degli agenti eziologici e la loro caratterizzazione genotipica, la loro circolazione e i possibili fattori concomitanti ed ambientali, possono differire tra popolazioni anche nell'ambito dello stesso territorio nazionale.

Ad esempio, in un'indagine epidemiologica condotta nella Regione Piemonte, è stata rivelata una prevalenza di infezione pari al 7,8% in donne asintomatiche di età compresa fra 25 e 70 anni con citologia cervicale normale⁴⁹. Il picco di prevalenza è stato registrato nella fascia di età 35-39 anni (13,9%), mentre non si

sono tratte informazioni sulla prevalenza nelle fasce di età più giovani.

In un altro recente studio condotto in Puglia è emerso che, su oltre 1000 campioni cervicali analizzati, il 33% è risultato positivo per HPV-DNA test, il genotipo 16 è risultato il più frequente tra quelli ad alto rischio sia nelle donne di età \leq 25 anni che nelle donne di età \geq 25 anni con una prevalenza, rispettivamente del 28% e del 25%, seguito dal genotipo 18 rinvenuto rispettivamente nel 12% e nell'11% dei casi positivi, nelle due fasce d'età³³.

In Sardegna, un recentissimo studio³⁴, condotto su una coorte di donne della provincia di Cagliari, ha evidenziato una prevalenza di infezione pari al 31% con una maggior prevalenza dei genotipi 16 e 18, identificati da soli o in associazione con altri genotipi.

Sulla base di tali premesse, già da qualche anno, l'Istituto di Igiene e Medicina Preventiva dell'Università degli Studi di Sassari, in collaborazione con l'Istituto di Anatomia Patologica e la Clinica Ostetrico Ginecologica dello stesso Ateneo, ha avviato un articolato progetto di ricerca allo scopo di definire, relativamente alla popolazione del nord Sardegna, le caratteristiche epidemiologiche, virologiche e di impatto di sanità pubblica dell'infezione da virus HPV, utili per la formulazione e la valutazione di interventi di prevenzione.

Il presente lavoro, che riporta i più recenti risultati del progetto, si pone come obiettivi di:

1) valutare attraverso un *cross sectional study*, condotto con l'utilizzo di metodiche analitiche molecolari, la prevalenza dell'infezione da HPV nelle donne di età compresa tra 15 e 70 anni;

- 2) identificare i genotipi virali "high risk" maggiormente diffusi nel territorio considerato;
- 3) correlare i risultati citologici, ottenuti attraverso il Pap test, con quelli molecolari;
- 4) ricercare nuovi markers di virulenza tramite l'applicazione di metodiche molecolari.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio oggetto della tesi ha previsto più fasi: nella prima, si è proceduto alla preparazione della documentazione necessaria per l'approvazione da parte del Comitato etico del Complesso Azienda Sanitaria Locale n. 1-Università di Sassari, ottenendo l'approvazione entro brevi tempi, ed alla stesura, così come previsto dal protocollo di ricerca, di un questionario per la raccolta dei dati clinici ed epidemiologici delle donne reclutate (Fig. 4).

Tali informazioni (Pap test precedenti, risultati citologici, colposcopici e istologici) sono state inserite in apposito database, ideato e realizzato *ad hoc* presso l'Istituto di Igiene dell'Università degli Studi di Sassari con Microsoft Access, al fine di ottenere un archivio omogeneo dei dati di laboratorio e clinici delle donne reclutate. L'analisi statistica dei dati è stata

effettuata utilizzando il software Stata 9.0 (StataCorp, Stata Statistical Software Release 9, College Station, TX, USA, 2005).

In particolare, è stata eseguita una analisi statistica descrittiva ed inferenziale per le variabili selezionate nel questionario di valutazione e per quelle virologiche, estrapolate dalle indagini di biologia molecolare. Medie e deviazioni standard sono state calcolate per variabili quantitative discrete e continue a distribuzione normale, mentre proporzioni sono state computate per variabili qualitative.

Per valutare il grado di influenza, in termini probabilistici, di covariate sul rischio di infezione da HPV e lesioni a carico della cervice uterina, è stata eseguita una analisi di regressione logistica univariata.

Il grado di significatività statistica è stato fissato al 5%.

Dopo aver effettuato un controllo di qualità relativo all'estrazione del DNA virale da campioni di cellule cervicali, si è

proceduto, presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Università e presso ambulatori specialistici della provincia di Sassari, con l'arruolamento, su base volontaria, di donne di età compresa tra 15 e 70 anni.

I campioni cervicali sono stati prelevati mediante il sistema Thin-Prep. Con un opportuno spazzolino ("Cervex Brush") le cellule cervicali sono state raccolte in vials contenenti 20 ml di PreservCyt® solution che consente di preservare gli acidi nucleici virali fino a 2 settimane a temperatura ambiente.

I campioni biologici sono stati quindi inviati all'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Sassari per l'analisi citologica ed all'Istituto d'Igiene e M.P. per la ricerca del DNA virale con saggio molecolare commerciale (INNO-LiPA Genotyping EXTRA) e con PCR Real-Time *home made*.

3.1 Analisi molecolare secondo il protocollo INNO-Lipa Genotyping Extra

L'analisi molecolare con il kit INNO-LiPA ha previsto l'estrazione del DNA secondo il protocollo del kit High Pure Viral Nucleic Acid della Roche (Tab. 5). Il DNA estratto, è stato sottoposto ad amplificazione con il Kit INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp, specifico per una porzione della regione L1 del virus del papilloma umano (HPV), di 65 pb.

In particolare, il campione di DNA da amplificare viene aggiunto ad un mix di reazione contenente un eccesso di deossinucleosidi 5'-trifosfati (dNTPs), primer biotilinati e DNA polimerasi termostabile (Tab. 6).

La miscela del campione viene riscaldata allo scopo di denaturare i due filamenti del DNA, ed esporre le sequenze target ai primers. Dopo 40 cicli, si ottiene una sequenza biotilinata amplificata.

L'amplificato così ottenuto viene analizzato tramite l'utilizzo di uno strumento semiautomatico (Auto-LiPA). I campioni, durante questa fase, sono sottoposti ad un test a sonde allineate (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra), per uso diagnostico in vitro, creato per l'identificazione di 25 genotipi diversi del virus del papilloma umano (HPV) 18 HR e 7LR, tramite rivelazione delle sequenze specifiche nella regione L1 del genoma dell' HPV.

Protocollo di estrazione del DNA.

- Aggiungere al campione di cellule 200 μ l di Binding Buffer e 50 μ l di Proteinasi K.
- Vortexare brevemente e incubare a 72°C per 10 minuti.
- Centrifugare velocemente.
- Aggiungere 100 μ l di Binding Buffer e vortexare 10".
- Trasferire il tutto in una colonnina tipo Qiagen col filtro.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluato, e tenere il filtro da trasferire in un'altra colonnina
- Aggiungere 500 μ l di Inhibitor Removal.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluato e trasferire il filtro in un'altra colonnina.
- Aggiungere 500 μ l di Washing Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare l'eluato e trasferire il filtro in una nuova provetta.
- Aggiungere 500 μ l di Washing Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Centrifugare per 10" alla massima velocità (14000 rpm).
- Eliminare l'eluato e trasferire il filtro dentro un'epENDORF.
- Aggiungere 50 μ l di Elution Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare il filtro e tenere l'eluato nella epENDORF.
- L'eluato può essere stoccato a -20°C.

Tab.5 : Protocollo di estrazione del DNA.

Protocollo di amplificazione del DNA

- Preparare una mastermix per N campioni in una provetta da 1,5 ml:
 - 20,3 μ l di H₂O mq sterile
 - 5 μ l di 10x Taq buffer
 - 10 μ l di Primer Mix
 - 4 μ l di MgCl₂
 - 0,4 μ l dNTPs
 - 0,3 μ l di Taq polimerasi
- Aliquotare 40 μ l di questa mastermix in provette da 0,2 ml
- Pipettare 10 μ l di DNA nella miscela PCR
- Aggiungere 10 μ l di Controllo PCR alla provetta di controllo positiva.
- Aggiungere 10 μ l di acqua distillata alla provetta di controllo negativa.
- Posizionare i campioni nel blocco termico preriscaldato e calibrato.

Tab.6 : Protocollo di amplificazione del DNA.

L'analisi si basa sul principio dell'ibridazione inversa: parte della regione L1 viene amplificata e i prodotti amplificati biotilinati, vengono quindi denaturati e ibridati con 28 sonde oligonucleotidiche specifiche che vengono immobilizzate come linee parallele sulla membrana di un'unica striscia di tipizzazione su cui sono fissate anche 4 linee di controllo sotto una linea di identificazione.

Dopo l'ibridazione e il lavaggio stringente, viene aggiunta streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, che si lega agli eventuali ibridi biotilinati formati in precedenza. L'incubazione col cromogeno BCIP/NBT (bromocloroindililfosfato/nitroblue tetrazolio), produce un precipitato color porpora e i risultati possono essere interpretati visivamente.

3.2 Real-Time PCR

Preliminarmente alla fase analitica, in collaborazione con la Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Medicina Clinica, Prevenzione e Biotecnologie Sanitarie dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca sono stati messi a punto saggi "Real-time PCR" con tecnologia TaqMan per la determinazione del *viral load* dei genotipi oncogeni di HPV più frequentemente rilevati nel carcinoma della cervice uterina (HPV 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 e 58).

I primers e probes utilizzati nelle diverse reazioni di amplificazione sono stati disegnati mediante programmi di simulazione al computer¹⁴, (selezionando le regioni genomiche (target virali) da amplificare, in modo da assicurare la minima formazione di strutture secondarie e la massima conservazione intraspecie.

Il grado di accuratezza, riproducibilità e ripetibilità dei tests analitici è stato valutato utilizzando standard per HPV-16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 e 58 ottenuti mediante tecnica di clonaggio dell'amplicone. Per ciascun test da validare sono stati eseguiti almeno 10 esperimenti distinti. L'accuratezza, definita come il livello di approssimazione di un valore ottenuto con una misurazione e un valore di riferimento preso come "gold standard", è stata stimata valutando la differenza aritmetica tra il numero di copie di genoma ottenuto mediante i due saggi e il numero teorico di copie atteso mediante la determinazione allo spettrofotometro. Il significato dell'errore sistemico è stato saggiato mediante test t-Student appaiato. La ripetibilità e riproducibilità delle reazioni sono state, invece, calcolate attraverso il coefficiente di variazione (CV; il rapporto tra la deviazione standard e la media di misurazioni ripetute) in differenti condizioni.

L'analisi dei campioni per il calcolo del *viral load* ha previsto l'applicazione del sistema di quantificazione del DNA umano mediante il "CCR5 quantitative detection system"³, indispensabile per la normalizzazione del valore di carica virale ottenuto espresso in numero di copie genomiche di HPV per 10⁴ cellule umane.

4. RISULTATI

Nel periodo novembre 2007 - gennaio 2009 sono stati analizzati n. 340 campioni citologici prelevati da donne di età compresa tra 15-67 anni (Fig. 5) (media \pm deviazione standard: 37 \pm 10,9).

La maggior parte del campione considerato presentava una età compresa tra i 25 e i 44 anni (58,5%) (Fig. 5). La razza prevalente era di tipo caucasico (95,9%) (Fig. 5), con un grado di istruzione superiore (scuole superiori o laurea: 75,5%) (Fig. 5).

Il 59,6% sono coniugate (Fig. 6), il 50% fumatrici o ex fumatrici (Fig. 6), nel 54% dei casi nullipare, per la maggior parte utilizzatrici di contraccettivi orali (Fig. 7). L'età media (deviazione standard) del primo rapporto sessuale è risultata di 19 (3,4) anni.

Per quanto concerne gli altri *items* inerenti alla sfera sessuale, emerge che il 35,7% ed il 37,5% ha presentato un

numero di partner pari a 2-3 e 4-9, rispettivamente; il 10,6% ha avuto almeno un nuovo partner negli ultimi tre mesi (Fig. 8).

Il 30% dichiara di non aver mai fatto uso del *condom* durante la propria vita sessuale (Fig. 9), mentre la proporzione di soggetti che dichiara di aver sofferto di infezioni sessualmente trasmesse è pari al 17,2% (Fig. 9).

Il 59,5% del campione ha eseguito l'esame citologico negli ultimi tre anni, valore sicuramente superiore rispetto alla media nazionale (39,8%) (Fig. 10).

La prevalenza dell'infezione è risultata pari al 35,3% (Fig. 11), valore che decresce linearmente nelle fasce di età più avanzate (30% nella fascia di età 25-34 e 35-44 anni, rispettivamente, e 3% in quella superiore ai 55 anni) (Fig. 12); tale aspetto è confermato anche considerando le donne con infezione sostenuta da genotipi ad alto rischio: 28% nella fascia di età 25-

34 anni, 31% in quella 35-44 anni e 3,6% in quella superiore ai 55 anni (Fig. 13).

La prevalenza dei genotipi ad alto rischio nel campione analizzato è risultata pari a 26,8%, mentre quella tra i campioni cervicali positivi all'infezione da HPV è risultata pari al 75,8% (Fig.14).

Di rilevante interesse è la proporzione delle coinfezioni pari al 17,5%, prevalentemente sostenute dai genotipi HPV 16 e 51 (57,1%) (Fig. 14).

Tra i diversi genotipi identificati (Fig. 15), HPV 16, 6, 51 e 11 sono quelli più prevalenti, tra quelli ad alto rischio (Fig. 16), l'HPV16 (55%) è risultato quello più frequente, seguito dal genotipo 51 con il 36,7%, dal 31 con il 10% e dai genotipi 18 e 45 con il 5% ed il 3,3% rispettivamente.

Tra quelli a basso rischio l'HPV 6 (45,5%), l'11 (21,2%) ed il 71 (9,1%) sono i genotipi più frequentemente isolati (Fig. 17).

Delle 340 donne considerate 256 (80,5%) sono risultate negative all'esame citologico; 33 (10,4%) hanno presentato lesioni non determinate (ASCUS), 25 (7,9%) lesioni di basso grado (LSIL) e 4 (1,3%) lesioni di alto grado (HSIL) (Fig. 18).

L'analisi di regressione logistica ha evidenziato come il dato anamnestico di infezioni sessualmente trasmesse sia associato ad un incremento della probabilità di uno stato di positività per HPV (Odds Ratio OR: 2,6; $p= 0,001$; IC 95%: 1,47 - 4,7), mentre l'incremento dell'età (OR: 0,9; $p< 0,001$; IC 95%: 0,93 - 0,98) ed un ritardato inizio dell'attività sessuale (OR: 0,9; $p= 0,006$; IC 95%: 0,83 - 0,97) si associa ad una riduzione statisticamente significativa del rischio di HPV-positività (Tab. 7).

Pur in presenza di un OR statisticamente significativo (OR: 2,8; $p= 0,008$; IC 95%: 1,31 - 6,2) per l'associazione tra lesioni citologiche e positività per l'infezione da HPV, la relazione positiva

tra citologia anomala ed infezione da singoli genotipi 16, 18 e 51 non raggiunge la significatività per il campione analizzato.

VARIABILI	OR	p	IC 95%
Storia di infezioni sessualmente trasmesse	2,6	0,001	1,47-4,7
Incremento età	0,9	<0,001	0,96-0,98
Ritardato inizio attività sessuale	0,9	0,006	0,83-0,97
titolo di studio	0,8	0,6	0,5-1,4
abitudine al fumo	1	0,8	0,7-1,6
uso contraccettivi orali	1,7	0,1	0,9-2,9
utilizzo preservativi	0,9	0,8	0,6-1,5
Lesioni citologiche	2,8	0,008	1,32-6,2
Lesioni citologiche causate da HPV18	2	0,5	0,2-17,9
Lesioni citologiche causate da HPV51	1,9	0,2	0,7-5,1
Lesioni citologiche causate da HPV16	4,1	0,1	0,6-30

Tab.7 : Risultati dell'analisi di regressione logistica univariata.

Per quanto concerne la valutazione della carica virale, i risultati ottenuti hanno evidenziato valori compresi tra un minimo 1 ed un massimo di 3.193.375 copie genomiche virali per 10⁴ cellule umane. Dalla correlazione tra il VL ed il grado di lesione, è emerso che le due variabili sono contraddistinte da un elevato grado di proporzionalità, con una maggiore associazione per HPV-16 (γ : 0.41). Alte cariche di HPVs sono associate allo sviluppo di HSIL

con un O.R. di 14,62 ($p: <0,01$) e, in particolare, i genotipi 16 e 18 hanno evidenziato una più elevata stima del rischio (O.R.: 23.1 e 13.1, rispettivamente).

5. DISCUSSIONE

I risultati emersi nel corso dell'indagine sono suggestivi di alcune considerazioni:

- la prevalenza per l'infezione cervicale da HPV riscontrata nel campione considerato è in linea con quanto evidenziato in studi analoghi condotti in altre realtà territoriali (35,3% vs 33% nella Regione Puglia e 31% in Provincia di Cagliari). La prevalenza varia in relazione alle diverse fasce d'età, con una diminuzione lineare con l'aumentare degli anni, aspetto ancora più marcato se si considerano gli HPV ad alto rischio oncogeno;
- di rilevante interesse è la elevata proporzione delle coinfezioni prevalentemente sostenute dai genotipi HPV 16 e 51; a tale proposito, sarebbe interessante monitorare nel tempo queste pazienti per determinare il possibile ruolo delle coinfezioni nell'eziopatogenesi del carcinoma cervicale;

- anche nel presente studio, il genotipo 16 è risultato essere il più frequente, seguito dal genotipo 51, mentre la circolazione del genotipo 18 è modesta. Gli elevati valori di prevalenza dell'HPV51, aspetto peraltro già segnalato in recenti studi italiani^{52,13,58} nei quali tale genotipo è tra quelli di più frequente isolamento (prevalenza compresa tra 12% e 15,3%) soprattutto in associazione con altri HR-HPV ed in pazienti con lesioni CIN2, potrebbero rappresentare, nel territorio sardo, una peculiarità epidemiologica del Nord Sardegna;

- per quanto concerne la valutazione del rapporto fra carica virale, ottenuta attraverso la real time PCR, e severità delle lesioni cervicali è emerso che la carica di HPV è un indicatore del rischio associato allo sviluppo di lesioni cervicali precancerose e potrebbe rappresentare un marcatore predittivo per lo sviluppo del cancro cervicale. Tale metodica, unitamente con la ricerca dei trascritti oncogeni, indicatori dell'attività replicativa del virus, potrebbero

rappresentare uno strumento aggiuntivo nello screening del cervicocarcinoma;

- l'analisi di regressione logistica ha evidenziato l'associazione tra lesioni citologiche e positività per l'infezione da HPV (OR: 2,8; p= 0,008). Tuttavia, per una corretta sorveglianza dell'infezione e delle sue recidive, è necessario utilizzare, negli screening, in modo combinato sia il PAP test che la ricerca del DNA virale. Tali metodiche diagnostiche sono caratterizzate, infatti, da valori di sensibilità e specificità diverse (PAP test: 94,6% e 55,4%; HPV DNA test: 94,1% e 96,8%)¹⁵. La maggiore sensibilità del test HPV nell'identificazione delle lesioni pre-cancerose di alto grado potrebbe permettere l'allungamento degli intervalli tra gli screening, fornendo uno strumento idoneo laddove le donne si sottopongono al controllo con minore frequenza. Tuttavia, tali test, almeno quelli commerciali e marcati CE, sono caratterizzati da costi ancora particolarmente elevati. L'introduzione di nuovi

test *home made* sul mercato ed una possibile maggiore domanda della loro esecuzione consentirà di ridurre i costi connessi;

- se l'abitudine al fumo e l'uso di contraccettivi orali non aumentano il rischio di infezione da HPV, l'età del primo rapporto ed il numero di partners sessuali si confermano quali fattori di rischio per l'infezione e sono indicativi della correttezza della strategia vaccinale che identifica le dodicenni come target ideale;
- l'attuazione dei programmi di vaccinazione per le adolescenti, che hanno avuto inizio a partire dal 2009, probabilmente modificherà il futuro scenario epidemiologico dell'infezione da HPV, con la diminuzione di circolazione dei genotipi oggi maggiormente prevalenti con altri di minore diffusione, nei confronti dei quali, peraltro, gli attuali vaccini non conferiscono protezione immunitaria. La sorveglianza di questo fenomeno deve essere, pertanto, costantemente monitorata attraverso tecniche di biologia molecolare che consentano una completa ed accurata

genotipizzazione, al fine di predisporre nuovi e più completi strumenti di prevenzione, come, ad esempio, lo sviluppo di nuovi vaccini rivolti verso genotipi ad alto rischio, non compresi negli attuali, particolarmente diffusi nelle diverse aree geografiche, o la cui prevalenza sarà destinata ad aumentare per il replacement che la vaccinazione avrà indotto.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) AIRT Working Group. Registri tumori in Italia: il rapporto 2006. *Epid & Prev* 2006;15:64-65.
- 2) Boulet G.A., Horvath C.A., Berghmans S., Bogers J. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Apr; 17(4): 810-7. Review.
- 3) Broccolo F., Chiari S., Piana A., Castiglia P., Dell'Anna T., Garcia-Parra R., Maneo A., Villa A., Leone E. B., Perego P., Maida A., Mangioni C., Cocuzza C. Prevalence and Viral Load of Oncogenic Human Papillomavirus Types Associated With Cervical Carcinoma in a Population of North Italy. *J Med Vir* 2009;1:278-287.
- 4) Burchell A.N., Richardson H., Mahmud S.M., Trottier H., Tellier P.P., Hanley J., et al. Modelling of sexual

- transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol* 2006;163:534-43.
- 5) Burk RD et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant riskfactors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 1996;174:679.
- 6) Castle P.E., Schiffman M., Burk R.D., Wacholder S., Hildesheim A., Herrero R. Restricted cross-reactivity of Hybrid Capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; pp. 1394-1399.
- 7) De Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthysubjects. *Cancer Res* 2002;62:472-9.

- 8) De Villers E.M., Bernard H.U., Broker T., Delius H. and Hausen H. Index of Viruses - Papillomaviridae. In: Büchen-Osmond C, editor. ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. New York, USA: Columbia University 2006.
- 9) De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- 10) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2001;101:525-41.
- 11) Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM, *GLOBCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide IARC CancerBase No 5, version 2.0. Lyon: IARC Press, 2004.*
- 12) Frazer IH, Cox JT, Mayeaux EJ, Franco EL, et al. *Advances in prevention of cervical cancer and other Human*

- Papillomavirus-related diseases. *Ped Infect Dis J* 2006; 25:S65-81.
- 13) Gargiulo F., De Francesco M.A., Schreiber C., Ciravolo G., Salinaro F., Vallencini B., Manca N., 2007. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res* 2007;125(2):176-182.
- 14) Gene Bank, BLAST, FASTA, Primer express; ESSA; (<http://genebee.msu.su>; <http://tbi.univie.ac.at>).
- 15) Gruppo di lavoro sulle vaccinazioni della Società Italiana di Igiene (Siti). Nuovi vaccini: evidenze scientifiche e raccomandazioni. Edizioni, Panorama della Sanità, 2009.
- 16) Hellberg D., Stendahl U. The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer. *Anticancer Res* 2005;25:3041-6.

- 17) Herrington C.S., Evans M.F., Hallam N.F., Charnock F.M., Gray W., McGee J.D. Human papillomavirus status in the prediction of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in patients with persistent low-grade cervical cytological abnormalities. *Br J Cancer*. 1995 Jan;71(1):206-9.
- 18) Ho G.Y., Bierman R., Beardsley L., Chang C.J., Burk R.D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):423-8.
- 19) Hopfl R., Heim K., Christensen N., Zumbach K., Wieland U., Volgger B., Widschwendter A., Haimbuchner S., Muller-Holzner E., Pawlita M., Pfister H., Fritsch P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 2000;356:1985-1986.
- 20) Howell-Jones R. Human papillomavirus vaccination: the United Kingdom's recommendation and update on European licensure and efficacy data. *Euro Surveill*. 2007;12(46):3309.

- 21) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenetic risks to Humans. Human papilloma Viruses. Lyon: International Agency of Research on Cancer.
- 22) IARC Working group on evaluation of carcinogenic risks to human. Human papillomaviruses Vol.64 of IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon:international agency for research on cancer, World Health Organization; 1995.
- 23) Jenson A.B., Kurman R.J., Lancaster W.D. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. *Dermatol Clin M* 1991;9:203-209.
- 24) Keng- Ling Wallin, Ph. D, Fredrik Wiklund, M.Sc., et al "Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer" *New England Journal of medicine* 1999;341:1633-1638.

- 25) Kiajer K Susanne, Adriaan J C van den Brule, Gerson Paull, Edith I Svare, Mark E Sherman, Birthe L Thomsen, Mette Suntum, Johannes E Bock, Paul A Poll, Chris J L M Meijer "Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study" *BMJ* 2002;325:1-7.
- 26) Klaes, R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59:6132-6.
- 27) Klingelhutz A.J., Foster S.A. and McDougall J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380:79-82.

- 28) Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, Coutlee F;
"Canadian Women's HIV Study Group. Prevalence of selective
inhibition of HPV-16 DNA amplification in cervicovaginal
lavages." J Med Virol. 2004 Jan;72(1):132-7.
- 29) Levi F, Lucchini F, Negri E, Franceschi S, La Vecchia C.
Cervical Cancer mortalità in young women in Europe: patterns
and trends. Eur J Cancer 2000;36:2266-2271.
- 30) Mackay IM, Arden KE, Nitsche "A Real-time PCR in
virology." Nucleic Acids Res. 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
Review.
- 31) Mark H., Stoler. New Bethesda Terminology and Evidence-
Based Management Guidelines for Cervical Cytology Findings.
JAMA 2002;287:2140-2141.
- 32) Martin C.M., Astbury K., McEvoy L., O'Toole S., Sheils O.,
O'Leary JJ. Gene expression profiling in cervical cancer:

- identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. *Methods Mol Biol* 2009; 511:333-59.
- 33) Martinelli D., Chironna M., Tafuri S., Neve A., Caputi G., Prato R., et al. Epidemiology of HPV infections and cervical cancer in Apulia: a survey study and current data analysis. *Ann Ig* 2007;19(6):499-508.
- 34) Masia G., Mazzoleni A.P., Contu G., Laconi S., Minerba L., Montixi S., Montis F., Onano A., Porcedda E., Coppola R.C. Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in women of Sardinia (Italy). *Vaccine*. 2009;27(1):A11-6.
- 35) Ministero della Salute, Direzione Generale della Prevenzione: Raccomandazioni per la pianificazione e l'esecuzione degli screening di popolazione per la prevenzione del cancro della mammella, del cancro della cervice uterina e

- del cancro del colon retto. Stampato da Graffiti, Pavona (Roma) 2006.
- 36) Molijn, A; Kleter, B; Quint, W; van Doorn, L; "Molecular diagnosis of human Papillomavirus (HPV) infections" Clin Virol 2005, 32 (5): S43-S45.
- 37) Mouglin C., Dalstein V., Prétet J.L., Gay C., Schaal J.P., Riethmuller D. Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge. Press Med. 2001 Jun 9;30(20):1017-23. Review. French.
- 38) Muñoz N, Castellsaguè X, Berrington de Gonzàles, Gissman L. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine 2006;24(3):1-10.
- 39) Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human Papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. Int J Cancer 2004;111:278-85.

- 40) Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Shah K.V. The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res.* 1994 Mar 1;305(2):293-301.
- 41) Munoz N., Bosch F.X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K.V., Snijders P.J., Meijer C.J. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- 42) National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology: Cervical Cancer Screening V.I. 2009

(http://www.gisci.it/documenti/altri_documenti/cervical_screening_nccn_2009.pdf).
- 43) Nobbenhuis, M.A.; Helmerhorst, T.J.; van den Brule, A.J.; Rozendaal, L.; Voorhorst, F.J.; Bezemer, P.D., "Cytological

- regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear" *Lancet* 2001;1782-1783.
- 44) Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden: *Globocan 2000*. *Int. J. Cancer* 2001;94:153-156.
- 45) Pisani P., Bray F., Parkin D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72-81.
- 46) Ragin C.C., Reshmi S.C., Gollin S.M. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int J Cancer* 2004 Jul 10;110(5):701-9.
- 47) Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, Meijer CJ, Kenemans P. "The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural

- history up to 36 months." *Int J Cancer*. 1995;61(3):306-11.
- 48) Ronco G., Giubilato P., Naldoni P., et al. Livello di attivazione e indicatori di processo dei programmi organizzati di screening dei tumori del collo dell'utero in Italia. In: Osservatorio Nazionale Screening. Quinto rapporto, 2006. Osservatorio Nazionale Screening.
- 49) Ronco G., Ghisetti V., Segnan N., et al. Prevalence of human papilloma virus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer* 2005;41:297-305.
- 50) Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, Beral V. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 2003;361:1159-67.
- 51) Solomon D, Nayar R. (Ed.). *The Bethesda system for reporting cervical cytology: definitions, criteria and*

explanatory notes. Second Edition. New York:Springer-Verlag
2005;191

- 52) Spinillo A., Dal Bello B., Gardella B., Roccio M., Dacco M.D.,
Silini E.M. Multiple human papillomavirus infection and high
grade cervical intraepithelial neoplasia among women with
cytological diagnosis of atypical squamous cells of
undetermined significance or low grade squamous
intraepithelial lesions. *Gynecol Oncol.* 2009 Apr;113(1):115-9.
- 53) Strauss S., Desselberger U., Gray J.J. Detection of genital
and cutaneous human papillomavirus types: differences in the
sensitivity of generic PCRs, and consequences for clinical
virological diagnosis. *Br. J. Biomed Sci* 2000; pp. 221-225.
- 54) Sun Y, Eluf-Neto J, Bosch FX, Munoz N, Walboomers JM,
Meijer CJ, et al. Serum antibodies to HPV 16 proteins in
women from Brazil with invasive cervical carcinoma. *Cancer
Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:935-40.

- 55) The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. NCI workshop. JAMA 1989;262:931-934.
- 56) Tornesello M.L., Duraturo M.L., Losito S., Botti G., Pilotti S., Stefanon B., et al. Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in penile carcinoma. Int J Cancer 2008;122:132-7.
- 57) Tranbaloc P. Natural history of precursor lesions of cervical cancer. Gynecol Obstet Fertil. 2008 Jun;36(6):650-5. Review. French.
- 58) Venturoli S., Ambretti S., Cricca M., Leo E., Costa S., Musiani M., Zerbini M.L. Correlation of high-risk papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment. J Med Virol 2008; 80:1434-1440.
- 59) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N.

"Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol. 1999;189(1):12-9.

60) Wright T.C., Schiffman M. Adding test Human Papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. NEJM 2003;6:489-490.