



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
XXIII CICLO

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

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SUL RAPPORTO TRA INFEZIONE DA
PAPILLOMAVIRUS E CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA NELLA
POPOLAZIONE DEL NORD SARDEGNA.
INDIVIDUAZIONE DI NUOVI MARKER INDICATORI DELL'ATTIVITÀ
REPLICATIVA ED ONCOGENA DEI VIRUS

Tutore:

Prof. ANDREA PIANA

Dottorando:

Dott.ssa Stefania Pischedda

Anno Accademico 2009/2010

INDICE GENERALE

1. PREMESSE	pag 3
1.1 Organizzazione del genoma virale	pag 4
1.2 Ciclo replicativo del virus	pag 9
1.3 Patologia associata all'infezione da HPV	pag 16
1.4 Classificazione epidemiologica dei genotipi oncogeni di HPV	pag 18
1.5 Classificazione delle lesioni precancerose	pag 21
1.6 Diagnosi	pag 25
1.7 Il Pap-test o test di Papanicolau	pag 25
1.8 Vaccinazione anti HPV	pag 28
2. SCOPO DELLA TESI	pag 32
3. MATERIALI E METODI	pag 36
3.1 Analisi molecolare secondo il protocollo INNO Lipa Genotyping Extra	pag 39
3.2 Real-Time PCR	pag 41
4. RISULTATI	pag 47
5. CONSIDERAZIONI	pag 56
6. BIBLIOGRAFIA	pag 61

1. PREMESSE

Il carcinoma della cervice uterina 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 ^(27,31). 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 ^(27,31).

È il primo tumore riconosciuto dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come totalmente riconducibile a un'infezione. Infatti, l'agente eziologico del carcinoma cervicale è il papillomavirus umano, ampiamente diffuso nella popolazione, che infetta sia uomini che donne ^(2,19). Si stima che oltre il 75% delle donne contragga un'infezione genitale da HPV (Human Papilloma Virus) nel corso della propria vita, ma solo in una minoranza dei casi essa risulta persistente e può condurre allo sviluppo di un tumore.

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 neoplasia.

1.1 Organizzazione del genoma virale

I Papillomavirus umani hanno una grandezza pari a 55 nm di diametro⁽²⁸⁾ ed un capsido formato da 72 capsomeri (12 pentameri e 60 esameri) a simmetria icosaedrica; sono privi di *envelope* (rivestimento esterno) e sono resistenti al calore, all'etere e agli acidi. Il genoma è formato da una molecola di DNA bicatenario a struttura circolare, di circa 8000 paia di basi associate ad istoni⁽³⁸⁾.

L'organizzazione del genoma è particolare: l'85% è costituito dalle "Open Reading Frame" (ORFs) e il restante 15% dalle "Long Control Region" (LCR) o "Upstream Regulatory Region" (URR), una regione genica regolatoria non codificante che regola la trascrizione (Fig. 1).

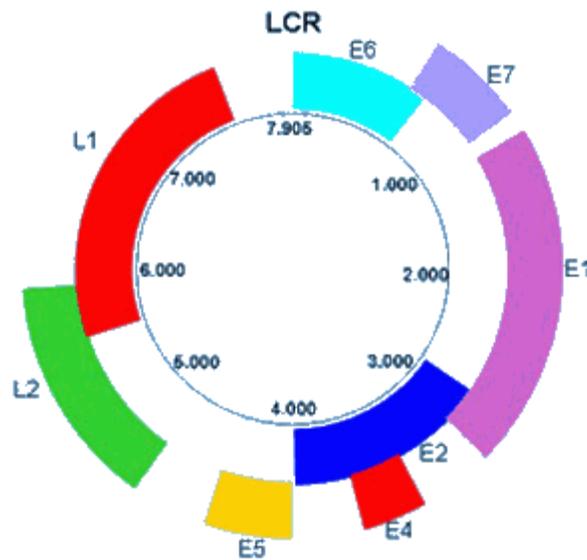


Fig. 1 : Rappresentazione schematica del genoma di HPV.

Tutte le ORFs sono localizzate in un unico filamento e vengono distinte in funzione del tempo di intervento nel corso dell'infezione virale in due regioni: le *early*, ossia precoci, che costituiscono il 45% del genoma virale, e *late*, ossia tardive, che rappresentano il restante 40% del genoma virale.

La regione *early* comprende otto geni che codificano per le proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7, espresse nella fase precoce e necessarie alla replicazione del DNA virale e per la trasformazione cellulare (oncogenesi); mentre le proteine E3 ed E8 hanno funzione sconosciuta ⁽³⁸⁾.

Le *late* codificano per proteine strutturali tardive (L1, L2) le quali si assemblano a formare il capside nel ciclo replicativo; in questa regione sono presenti elementi di controllo per la trascrizione e la replicazione ^(7, 29, 4) (tab. 1).

ORFs	FUNZIONE
E1	Mantiene il DNA virale in condizione extracromosomiale
E2	Codifica per proteine chiave nella regolazione del genoma virale che svolgono sia funzione di attivazione che di repressione sulla trascrizione del DNA
E3	Funzione sconosciuta
E4	Codifica per una proteina tardiva, il cui ruolo preciso è ignoto, ma che si ritiene causare le caratteristiche modificazioni citopatiche virali (induce il collasso della citocheratina citoplasmatica fino alla formazione dell'alone citoplasmatico: coilocitosi).
E5	Sembra essere coinvolto nella trasformazione cellulare in quanto interagisce con i recettori del fattore di crescita della membrana cellulare, quale il recettore β per il PDGF (platelet-derived growth factor), di cui mima

	le funzioni.
E6	Codifica per proteine in grado di degradare la p53, inducendo quindi la proliferazione e la trasformazione cellulare.
E7	Codifica per una proteina trasformante dell' HPV, si lega alla proteina retinoblastoma (RB) determinando una disattivazione degli oncosoppressori a cui segue una eventuale trasformazione.
E8	Funzione sconosciuta
L1	Codifica per la proteina L1, proteina maggiore del capsido comune a tutti gli HPV, contro la quale viene prodotta la maggior parte degli anticorpi.
L2	Codifica per la proteina L2, proteina minore del capsido, che presenta un'elevata variabilità tra i differenti tipi di HPV.

Tab. 1: Funzioni delle regioni *early* e *late* di HPV.

La regione genica regolatoria di 400-1000 paia di basi denominata LCR (Long Control Region) si trova a monte dei geni E6 ed E7 in cui sono concentrate tutte le sequenze regolatorie per la replicazione e la trascrizione. Questa regione contiene l'origine di replicazione virale, quattro siti di legame per la proteina virale E2 e numerosi siti di legame per fattori di trascrizione cellulare ⁽¹³⁾.

Studi funzionali sugli HPV hanno dimostrato che i prodotti dei due geni precoci, E6 ed E7, ricoprono un ruolo chiave nella trasformazione maligna indotta dal virus. Queste oncoproteine sono capaci di legare proteine cellulari modificando o alterando la normale funzione. I due esempi più studiati sono l'interazione di E6 con la proteina cellulare p53 e di E7 con il retinoblastoma (pRb) (Tab. 2). L'inibizione di p53 ed pRb porta alla completa perdita del controllo del ciclo cellulare e della apoptosi, facilitando quindi la trasformazione neoplastica.

Oncoproteine virali	Funzioni identificate
E6	<ul style="list-style-type: none"> • Immortalizzazione cellulare • Degradazione di proteine specifiche della cellula ospite (p53) a seguito del legame alla proteina E6 • Effetto anti-apoptotico • Destabilizzazione cromosomiale • Aumento della integrazione e mutagenesi del DNA • Attivazione delle telomerasi • Immortalizzazione cellulare • Attivazione di cicline E e A
E7	<ul style="list-style-type: none"> • Inattivazione di proteine pocket correlate al RB • Induzione dell'apoptosi • Inibizione delle chinasi inibitorie-ciclina

dipendenti

- Aumento della integrazione e mutagenesi del DNA
-

Tab. 2: Funzioni delle oncoproteine E6 e E7.

1.2 Ciclo replicativo del virus

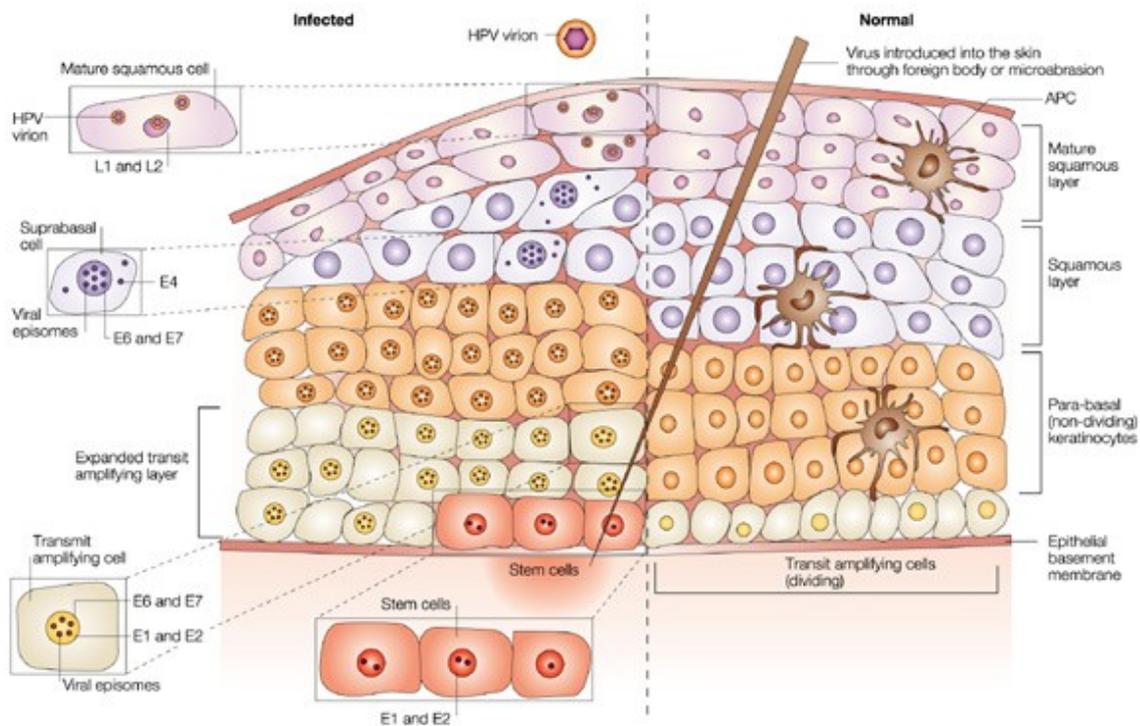
Il normale ciclo di replicazione virale di HPV è un processo altamente regolato, dipendente sia da alcune proteine codificate dal proprio genoma, che dal grado di differenziazione della cellula epiteliale ospite. I papillomavirus sono perfettamente adattati al tessuto del loro ospite naturale, le cellule epiteliali della cute e delle mucose e sono in grado di volgere i processi cellulari al proprio scopo ⁽¹³⁾. Il virus si replica solo nelle cellule epiteliali in fase di differenziamento ⁽²⁶⁾ e ciò è dimostrato dal fatto che le sue funzioni replicative, come la sintesi del DNA, la produzione di proteine capsidiche e il montaggio dei virioni, hanno

luogo unicamente a livello delle cellule soprabasali in differenziamento terminale.

Le fasi iniziali della replicazione sono essenzialmente tre: adsorbimento ai recettori, penetrazione e liberazione del capsido.

L'infezione virale inizia con il legame del virione alla superficie delle cellule bersaglio nello strato basale dell'epitelio, a seguito di piccoli traumi che permettano l'esposizione dello strato basale dei cheratinociti al virus. Infatti, perché si produca l'infezione attiva, il virus deve poter accedere al compartimento "generativo" dell'epitelio; tale condizione potrebbe spiegare l'estrema suscettibilità della zona di trasformazione della cervice uterina all'infezione virale dato che in quest'area le cellule appaiono costantemente esposte all'ambiente. Così il virus raggiunge, in seguito a piccole ferite o traumi della mucosa, le cellule basali e parabasali dell'epitelio squamoso ^(18, 24), si lega ai loro recettori ed entra attraverso dei piccoli varchi ⁽¹¹⁾.

I recettori cellulari coinvolti nell'adsorbimento del virus non sono ancora stati chiaramente identificati, anche se sembrano avere un ruolo determinante i proteoglicani, presenti sulla superficie cellulare. Le particelle virali vengono poi inglobate nella cellula attraverso la formazione di fagosomi e poi trasportate nel citoplasma, dove avviene il denudamento capsidico (Fig. 2).



Nature Reviews | Immunology

Fig. 2: Epitelio normale ed epitelio infettato.

La replicazione del DNA si verifica secondo due diverse modalità.

Nelle cellule degli strati inferiori dell'epitelio, e in particolare nello strato basale, il DNA virale è mantenuto in alcune copie come plasmide nucleare stabile, che esprime solo alcuni geni precoci e si riproduce mediamente una volta per ciclo cellulare.

Il DNA è equamente distribuito alle cellule figlie, assicurando la persistenza dell'infezione latente nelle cellule progenitrici dell'epitelio.

Il DNA virale si replica come plasmide insieme al DNA cellulare, sino a raggiungere approssimativamente 10-200 copie per cellula.

A livello delle cellule basali, l'espressione dei geni virali è limitata a specifici geni precoci; alcuni di questi, in particolare E5, E6 ed E7, stimolano la cellula infettata a proliferare e ad espandersi lateralmente. Un gruppo di cellule figlie, in cui le copie di DNA virale sono state equamente ripartite, lascia la membrana basale per stratificare e differenziare, permettendo l'ingresso del virus negli strati superiori dell'epidermide (strati soprabasale e spinoso).

Il ciclo replicativo completo del virus con produzione di una progenie virale matura è tipico delle infezioni da HPV a basso o medio rischio, in cui il genoma del virus permane in forma plasmidica. Invece, nelle lesioni ad alto grado indotte da HPV ad alto rischio, come il 16 o il 18, avviene l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite con conseguente mancata produzione di virioni. L' integrazione presuppone rottura e linearizzazione della molecola del DNA virale ed il legame covalente degli estremi della molecola linearizzata con il DNA cellulare. La rottura avviene tra le regioni E1 ed E2 con conseguente perdita dell'azione repressiva di E2 sulla trascrizione dei geni precoci E6 ed E7 (8,35).

Pertanto nelle cellule tumorali indotte da HPV ad alto rischio, i geni E1, E6 ed E7 sono integrati e funzionali e i geni E2, E4 ed E5 vengono persi o non sono trascritti: tutto ciò causa una sovrapproduzione delle oncoproteine E6 ed E7 responsabili principali dell'azione oncogena.

Questo meccanismo di integrazione determina dunque l'inizio dei processi di trasformazione e immortalizzazione dei cheratinociti (Fig. 3)⁽¹⁴⁾.

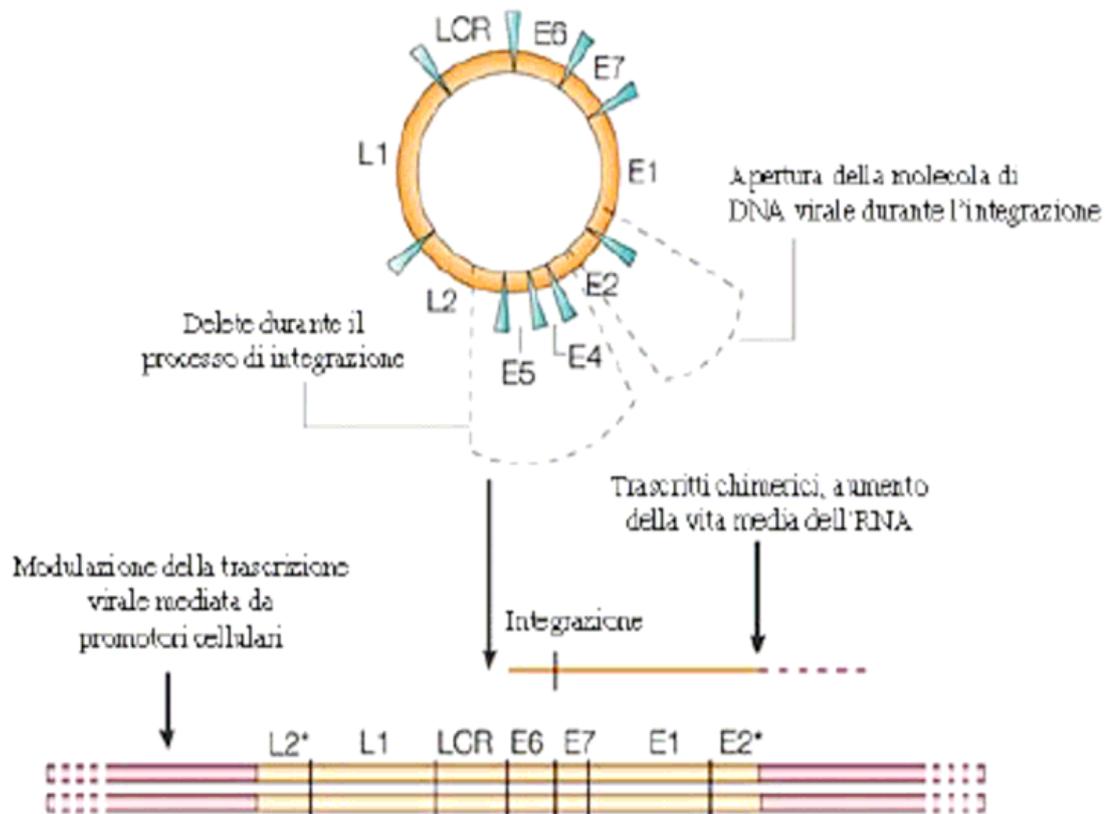


Fig.3 : Meccanismo di integrazione dei papillomavirus ad alto rischio oncogenico.

Notoriamente, le infezioni da HPV sono estremamente comuni e normalmente sono mantenute in uno stato subclinico dal sistema immunitario funzionale, ma possono essere riattivate da condizioni di immunosoppressione^(11,12).

Il sistema immunitario è fondamentale nel controllare la persistenza virale, ma i papillomavirus implicati nel cancro della cervice uterina possono causare infezioni persistenti e sviluppano una serie di meccanismi per limitare le possibilità di cattura da parte del sistema immune: ad esempio, le proteine precoci che mediano la proliferazione cellulare negli strati più bassi dell'epitelio sono espresse a livelli inferiori rispetto al livello soglia di rilevamento da parte del sistema immunitario, e ciò comporta una risposta immune non attivata ed inefficace ⁽¹¹⁾.

I tumori generalmente insorgono in donne che non riescono ad eliminare l'infezione e che mantengono l'espressione degli oncogeni per anni; tuttavia, nella maggior parte di esse la regressione immune porta o alla eliminazione del virus od al suo mantenimento in uno stato latente od asintomatico nelle cellule basali dell'epidermide ⁽¹¹⁾.

L'infezione latente è ancora poco chiarita biologicamente e molto discussa; non è noto per quanto tempo l'HPV possa mantenere tale eventuale stato o in quale percentuale di casi l'infezione possa progredire

in infezione produttiva. Si ritiene che l'infezione latente necessiti della espressione di E1 ed E2, necessari per il mantenimento del genoma nello strato basale e non dei geni E6 ed E7 ⁽¹²⁾.

1.3 Patologia associata all'infezione da HPV

Le donne possono contrarre l'infezione da HPV entro pochi anni dall'inizio della loro attività sessuale. L'infezione determina 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) ^(6,12). Soltanto una bassa percentuale di donne mantiene un'infezione persistente (circa il 10% dopo 5 anni), con un aumentato rischio (più del 50%) di sviluppare lesioni precancerose ⁽¹⁵⁾; sono inoltre molto diffuse anche le infezioni multiple e sequenziali con differenti tipi oncogeni di HPV 35,9 (Fig. 4).

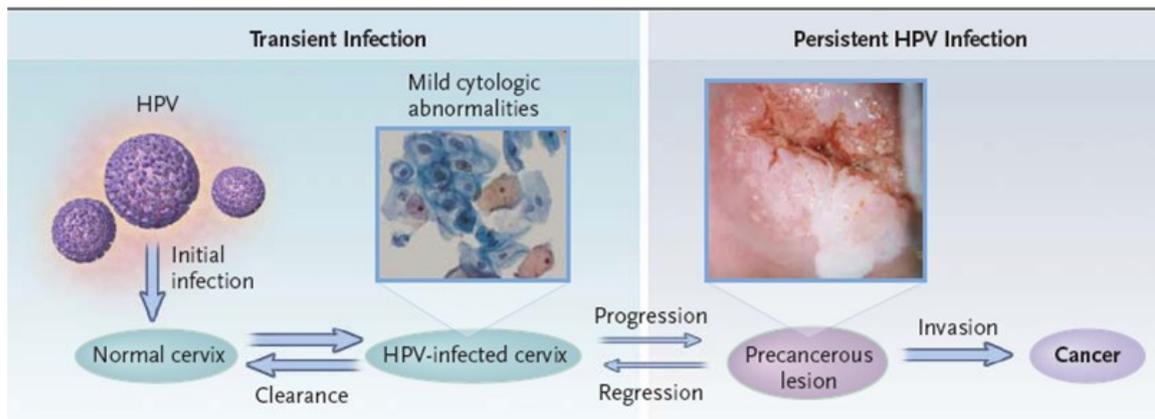


Fig.4 : Storia naturale della carcinogenesi della cervice uterina.

L'acquisizione di un genotipo virale ad alto rischio aumenta la probabilità di infezione persistente ⁽⁵⁾ in questo caso si possono sviluppare lesioni precancerose che possono poi progredire fino al cancro della cervice. 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 ^(36,34,10).

Si ritiene che la presenza di fattori di rischio che concorrono con l'infezione virale possa essere una causa dell'oncogenesi mediata da HPV; ad esempio, l'elevato numero di partner sessuali, il fumo di sigaretta, l'uso

a lungo termine di contraccettivi orali e la coinfezione con altre infezioni sessualmente trasmesse quali *Chlamydia trachomatis* ed virus dell'Herpes simplex (di tipo 1,2) ^(16,3).

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 ^(17,22,32).

1.4 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 uterina ⁽²³⁾ e degli stadi pre-neoplastici. Dai risultati tratti da 11 studi caso-controllo ⁽²⁵⁾ 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 (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , λ , μ , ν , χ , \omicron , π).

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 diversi ⁽²¹⁾.

15 genotipi sono stati classificati come "high risk" (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 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. 3).

Da studi epidemiologici emerge che il genotipo 16 è il più frequente (53-68%) tra quelli identificati nei vari paesi ⁽³⁰⁾; 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. 5).

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. 3: Classificazione filogenetica ed epidemiologica dei vari genotipi di HPV.

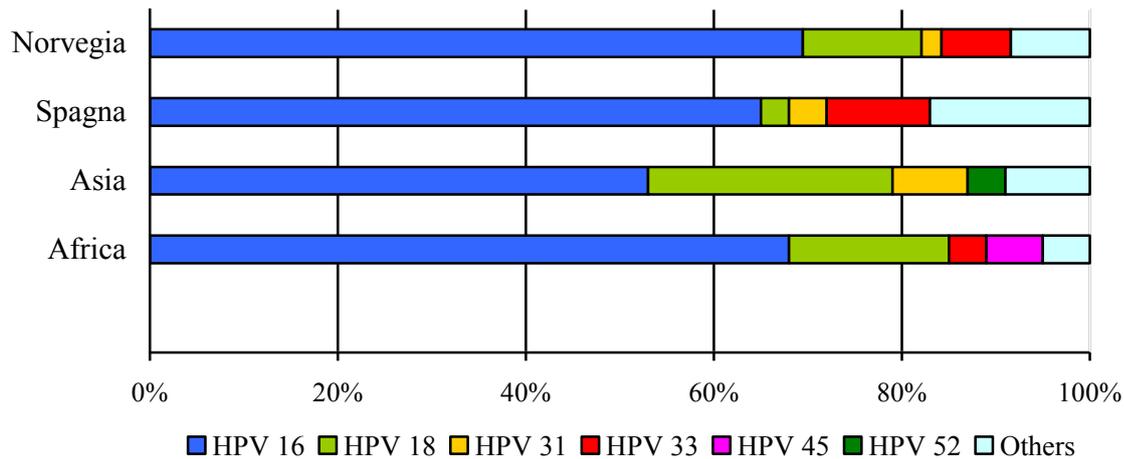


Fig. 5 :Distribuzione dei genotipi maligni di HPV nei vari Paesi.

1.5 Classificazione delle lesioni precancerose

I papillomavirus umani sono abitualmente distinti , in relazione alla localizzazione delle lesioni in cui solitamente si rilevano, (Tab. 4) in genotipi cutanei o mucosi.

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.

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. 5).

<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> Condilomi acuminati e piani Condiloma gigante Papillomi laringe e vie respiratorie Lesioni orali (iperplasia focale, papillomi) CIN, Carcinoma della cervice uterina, carcinoma della vulva	6, 11, 42, 43, 44, 54, 55 6, 11 6, 11 2, 11, 13, 32 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.4 : Genotipi di HPV associati alle differenti patologie.

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".

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) HIGH-SIL: Lesione intraepiteliale squamosa di alto grado (CIN2-3)	AGUS: Cellule ghiandolari atipiche di significato indeterminato

Tab. 5 :Terminologia delle lesioni cervicali pre-cancerose.

1.6 Diagnosi

Uno degli aspetti più interessanti nella clinica del cancro del collo dell'utero è legato alla possibilità di ottenere una diagnosi precoce, individuando la neoplasia quando non ha dato manifestazioni cliniche e non ha iniziato ad invadere il connettivo sottoepiteliale.

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.

1.7 Il Pap Test o Test di Papanicolaou

Il Pap Test (Fig. 6) 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 ^(25, 20).

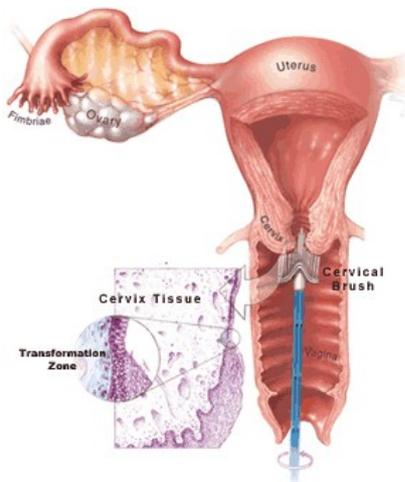


Fig. 6 : Modalità di esecuzione del prelievo

Papanicolaou pubblicò una classificazione costituita da 5 classi (Tab.

6):

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. 6: Classi secondo Papanicolaou.

Sono diversi i vantaggi di questo test. 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 però non è un esame diagnostico, ma è un test di screening in grado 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.

1.8 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 naturali.

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 vaccinoprofilassi 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'infezione.

Esistono oggi sul mercato due vaccini, il Cervarix (bivalente) ed il Gardasil (tetravalente) 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 HPV ^(1, 9,33, 30, 37)

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 mondo; 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 DELLA TESI

Il legame eziologico tra tumore cervicale ed infezioni da papillomavirus umano ha stimolato l'interesse della ricerca scientifica finalizzata sia all'individuazione di nuovi test diagnostici da impiegare per lo screening o per studi di tipo epidemiologico, sia nel vasto campo della vaccinoprofilassi.

Problematiche diverse ma che perseguono la stessa finalità; infatti, 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.

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

Inoltre, il ruolo degli agenti eziologici e la loro caratterizzazione genotipica, la loro circolazione e i possibili fattori concomitanti ed

ambientali, possono essere differenti tra popolazioni anche nell'ambito dello stesso territorio nazionale.

Ad esempio, in un'indagine epidemiologica condotta nella Regione Piemonte, ha rilevato una prevalenza di infezione pari al 7,8% in donne asintomatiche di età compresa fra 25 e 70 anni con citologia cervicale normale ⁽²⁹⁾. 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 ≤ 25 anni che nelle donne di età ≥ 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'età ⁽¹⁶⁾.

In Sardegna, un recentissimo studio ⁽²⁰⁾, 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 recentemente presso l'Istituto di Igiene e Medicina Preventiva dell'Università degli Studi di Sassari è stato 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 ulteriori interventi di prevenzione. Lo studio prevede l'utilizzo di metodiche molecolari che permettano di individuare i genotipi di HPV maggiormente diffusi tra quelli a "maggiore rischio", e di valutare altri fattori di virulenza degli HPV quali la loro capacità replicativa e l'attività oncogena, fattori non valutabili con i test molecolari attualmente in uso.

La presente tesi di dottorato, che riporta i più recenti risultati ottenuti nell'ambito del progetto di ricerca, si pone come obiettivi di:

- 1) valutare attraverso un *cross-sectional study* la prevalenza dell'infezione da HPV nelle donne di età compresa tra 15 e 60 anni;
- 2) identificare i genotipi virali "high risk" maggiormente diffusi nel territorio considerato;
- 3) determinarne la carica virale, indice di replicazione virale, marker surrogato della persistenza virale;
- 4) correlare i risultati citologici, ottenuti attraverso il Pap test, con quelli molecolari;
- 5) valutare, attraverso un'indagine retrospettiva, la presenza del DNA degli HPV in frammenti biotici paraffinati di cervice uterina, prelevati da pazienti con lesioni classificate come displasia di grado lieve (CIN1), moderato (CIN2), severo (CIN3) e carcinoma infiltrante.

3. MATERIALI E METODI

Per lo studio *cross - sectional* sono state previste 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; contestualmente è stato predisposto un questionario (Fig. 7) per la raccolta dei dati clinici ed epidemiologici delle donne reclutate.

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%.

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

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 Real-time PCR *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 QIAamp DNA Mini

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'eppendorf.
- Aggiungere 50 μ l di Elution Buffer.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1'.
- Eliminare il filtro e tenere l'eluato nella eppendorf.
- L'eluato può essere stoccato a -20°C.

Tab.7 : Protocollo di estrazione del DNA.

Il DNA estratto è stato amplificato tramite Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando il kit INNO-Lipa Genotyping Extra specifico per la regione L1, altamente conservata, del papillomavirus umano.

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.8 : Protocollo di amplificazione del DNA.

L'amplificato è stato analizzato tramite kit commerciale INNO-Lipa Genotyping Extra Amp, test a sonde che consente di identificare 28 diversi genotipi del papilloma virus umano, tramite rilevazione delle sequenze specifiche nella regione L1 del genoma dell'HPV.

Questa analisi si basa sul principio di ibridazione inversa: parte della regione L1 del virus viene amplificata utilizzando i primers SPF10, e i

prodotti amplificati biotinilati, in seguito all'aggiunta di buffer di reazione, vengono quindi denaturati e ibridati con sonde oligonucleotidiche specifiche.

Tutte le sonde sono immobilizzate come linee parallele sulla membrana delle strisce. Dopo l'ibridazione e il lavaggio stringente, viene aggiunta streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, che si lega agli eventuali ibridi biotinilati formatisi in precedenza.

L'incubazione con il cromogeno BCIP/NBT 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 computer (Gene Bank, BLAST, FASTA, Primer express; ESSA; <http://genebee.msu.su>; <http://tbi.univie.ac.at>), 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 10^4 cellule umane.

Il DNA estratto tramite kit QIAamp DNA è stato quindi amplificato secondo il protocollo di PCR Real-time *home-made*:

1) Preparazione della mastermix

Aggiungere 12.5 μl di Master Mix, 0.75 μl primers (10 μM) e 1 μl di probe (5 μM) alla concentrazione ottimizzata per ogni campione

2) Preparazione della piastra da 96 well

Aliquotare in ogni pozzetto 15 μl della miscela di reazione. Aggiungere 10 μl di campione precedentemente riscaldato in termoblocco a 56°C

3) Reazione

Posizionare la piastra nell'apposito supporto in ABI PRISM 7900, definire le impostazioni di temperatura e cicli

4) Analisi dei risultati

Analizzare mediante software SDS i risultati ottenuti.

Tab.9: tabella amplificazione

Contestualmente, è stata avviata l'indagine retrospettiva allo scopo di evidenziare se il quadro epidemiologico emerso dallo studio *cross-sectional*, caratterizzato da una spiccata presenza soprattutto dei genotipi HPV 16 e 51, fosse una realtà epidemiologica del territorio del nord dell'Isola. Allo scopo, sono stati richiesti all'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Sassari frammenti biotici paraffinati di cervice uterina, prelevati nel corso degli ultimi 10 anni, da

pazienti con lesioni classificate come displasia di grado lieve (CIN1), moderato (CIN2), severo (CIN3) e carcinoma infiltrante.

Nel complesso, sono stati analizzati, con saggio molecolare commerciale (INNO-LiPA), n. 155 frammenti cervicali (30 CIN 1, 29 CIN 2, 27 CIN 3 e 69 K infiltranti).

Prima dell'estrazione del DNA, i campioni sono stati sottoposti a diversi passaggi al fine di eliminare la presenza di paraffina.

Il primo passaggio ha previsto, per ogni campione, l'aggiunta 1200 μ l di xilene. Dopo aver vortexato vigorosamente, si è proceduto con la centrifugazione per 5 minuti a 14.000 rpm. Rimosso il surnatante, sono stati aggiunti 1200 μ l di etanolo (96-100%).

Successivamente i campioni sono stati ricentrifugati sempre per 5 minuti a 14.000 rpm, ripetendo tale passaggio dalle 5 alle 7 volte.

Quindi si è passati alla fase di estrazione del DNA dalle porzioni di tessuto sparaffinato seguendo il protocollo del kit QIAamp DNA Mini e la

genotipizzazione tramite kit commerciale INNO-Lipa Genotyping Extra
Amp.

Stefania Pischedda

Studio epidemiologico sul rapporto tra infezione da Papillomavirus e carcinoma della cervice uterina
nella popolazione del Nord Sardegna. Individuazione di nuovi marker indicatori dell'attività replicativa
ed oncogena dei virus

Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

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. 8) (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. 8). La razza prevalente era di tipo caucasico (95,9%) (Fig. 8), con un grado di istruzione superiore (scuole superiori o laurea: 75,4%) (Fig. 8).

Il 52% sono coniugate (Fig. 9), il 50% fumatrici o ex fumatrici (Fig. 9), nel 54% dei casi nullipare, per la maggior parte utilizzatrici di contraccettivi orali (Fig. 10). 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 37,5% ed il 18,9% 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. 11).

Il 28,6% dichiara di non aver mai fatto uso del *condom* durante la propria vita sessuale (Fig. 12), mentre la proporzione di soggetti che dichiara di aver sofferto di infezioni sessualmente trasmesse è pari al 17,2% (Fig. 12).

Il 58,1% del campione ha eseguito l'esame citologico negli ultimi tre anni, valore sicuramente superiore rispetto alla media nazionale (39%) (Fig. 13).

La prevalenza dell'infezione è risultata pari al 35,3% (Fig. 14), 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. 15); 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. 16).

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. 17).

Tra i diversi genotipi identificati (Fig. 18), HPV 16, 6, 51 e 11 sono quelli più prevalenti, tra quelli ad alto rischio (Fig. 19), 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. 20).

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. 21).

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. 10).

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.10 : Risultati dell'analisi di regressione logistica univariata.

Per quanto concerne la valutazione della carica virale determinata con la PCR Real-time, i risultati ottenuti sui campioni biologici positivi con il kit Inno-LiPA per i genotipi rilevabili con la metodica *home-made*, sono riportati nella seguente tabella:

			copie/10 ⁴ cells						
	Campioni positivi DNA	istologico	hpv16	hpv18	hpv31	hpv33G	hpv45	hpv51	INNOLIPA
1	5	negativo	0	5689	4234	0	0	0	18,31,53,58,6,40
2	12	negativo	0	2234	0	0	0	0	18,6
3	15	ASCUS	0	1285	0	0	0	0	18,69,71
4	19	negativo	136	0	0	0	0	0	16
5	39	negativo	0	0	0	0	1550	0	45
6	40	negativo	257	0	2245	0	0	0	16,31
7	45	negativo	0	0	0	2820	0	0	33
8	52	negativo	1	0	0	0	0	0	16
9	59	ASCUS	0	83	5890	0	0	0	18,31
10	66	CIN1	9.137	0	0	0	0	0	16
11	67	CIN1	8.585	0	0	0	0	1890	16,51
12	69	CIN1	12267	0	0	0	0	0	16

51

Stefania Pischedda

Studio epidemiologico sul rapporto tra infezione da Papillomavirus e carcinoma della cervice uterina nella popolazione del Nord Sardegna. Individuazione di nuovi marker indicatori dell'attività replicativa ed oncogenica dei virus

Tesi di dottorato in Scienze biomediche
Università degli Studi di Sassari

13	71	negativo	345	0	0	0	0	4450	16,51
14	121	negativo	223	0	0	0	0	890	16,51
15	135	negativo	657	0	0	0	0	2236	16,51
16	136	negativo	779	0	0	0	0	457	16,51,6
17	138	ASCUS	1279	0	0	0	0	3341	16,51,11
18	140	negativo	667	0	0	0	0	0	16
19	141	negativo	0	2239	0	0	0	0	18,6
20	144	negativo	0	0	970	0	0	0	31
21	145	negativo	2340	0	0	0	0	23451	16,51
22	146	negativo	112	0	0	0	850	0	16,45,11
23	147	negativo	779	0	0	0	0	1998	16,51,66
24	148	negativo	996	0	0	0	0	892	16,51,11
25	150	negativo	0	0	0	2239	0	0	33
26	157	negativo	335	0	0	0	0	6675	16,51
27	159	negativo	1130	0	0	0	0	0	16
28	163	CIN1	15650	0	16790	6745	0	0	16,31,33,44
29	181	negativo	962	0	0	0	0	443	16,51
30	184	CIN1	5678	0	0	0	0	0	16
31	210	ASCUS	0	0	3390	0	0	0	31
32	211	negativo	1289	0	0	0	0	4432	16,51
33	212	negativo	453	0	0	0	0	2112	16,51
34	216	negativo	881	0	0	0	0	989	16,51
35	LE22B	negativo	671	0	0	0	0	0	16
36	LE23B	negativo	1470	0	0	0	0	6745	16,51
37	LE25B	negativo	2134	0	0	0	0	247	16,51,6
38	LE26B	negativo	779	0	0	0	0	3908	16,51
39	LE27B	negativo	561	0	0	0	0	0	16
40	LE28B	negativo	991	0	0	0	0	1554	16,51
41	LE48B	CIN2	0	0	0	8740	0	756	33,51
42	LE139	-	4457	0	0	0	0	881	16,51
43	LE132	-	3278	0	0	0	0	3345	16,51
44	LE149	negativo	959	0	0	0	0	0	16
45	LE148	negativo	779	0	0	0	0	0	16
46	LE165	negativo	1590	0	0	0	0	0	16
47	LE209	LSIL	34750	0	0	0	0	12987	16,51
48	LE207	-	3489	0	0	0	0	0	16
49	LE213	-	0	0	15780	0	0	0	31

Tab.11: risultati carica virale

Per quanto riguarda l'HPV16, i valori di *viral load* sono compresi tra un minimo di 1 ed un massimo di 34.750 copie genomiche virali per 10⁴ cellule umane; l'HPV 18 tra 83 e 5.689 copie genomiche virali/10⁴; l'HPV31

tra 970 e 16.790 copie genomiche virali/10⁴; l'HPV33 tra 2.239 e 8.740 copie genomiche virali/10⁴; l'HPV45 tra 247 e 12.987 copie genomiche virali/10⁴; infine l'HPV51 tra 247 e 23.451 copie genomiche virali/10⁴.

Per quanto concerne i risultati inerenti l'indagine retrospettiva, il 64,5% dei campioni biotici paraffinati analizzati è risultato positivo all'analisi molecolare per la ricerca degli HPV (Fig. 22).

Tale valore, riferito anche a campioni classificati come carcinoma infiltrante o con grado di displasia severa (CIN3), appare sicuramente inferiore rispetto a quello atteso. Presumibilmente, la presenza della paraffina potrebbe aver influito sulla *performance* delle reazioni di amplificazione.

Nel 69% dei campioni risultati positivi si è evidenziata la presenza di singoli genotipi di HPV, tutti ad alto rischio, mentre nel 31,5% la presenza di confezioni, prevalentemente sostenute dall'associazione tra i genotipi 16 e 51 (18%).

Complessivamente, tra tutti i genotipi di HPV potenzialmente evidenziabili con il saggio molecolare, quello a maggiore prevalenza è risultato essere l'HPV16 (67%), seguito dal HPV51 (24%) e HPV52 (9%) (Fig. 23).

L'HPV18, uno dei genotipi più spesso identificati in lesioni cervicali, peraltro particolarmente diffuso nel territorio del sud dell'isola (39), è stato invece rilevato in una percentuale piuttosto contenuta (4%).

Considerando i genotipi HPV ad alto rischio l'HPV16, HPV51, HPV52 e HPV31 sono quelli più frequenti (Fig. 24), mentre tra gli HPV a basso rischio, quelli a maggiore frequenza sono risultati l'HPV71 (42,9%) e HPV69 (42,9%) (Fig. 23).

Considerando nello specifico i genotipi maggiormente rilevati nei diversi stadi di lesione l'HPV16 è risultato a maggiore prevalenza in lesioni CIN1 (66,7%) (Fig. 25), l'HPV31 e HPV51 in lesioni di grado CIN2 (40% e 30% rispettivamente) (Fig. 26), mentre in lesioni di tipo CIN3, HPV16 (68%), HPV52 (16%) e HPV18 (12%) sono risultati i più frequenti (Fig. 27).

Nei frammenti di carcinoma infiltrante, invece, l'HPV16 (80%) e HPV51 (33,9%) sono i genotipi maggiormente rappresentati (Fig. 28).

Correlando i risultati ottenuti dall'analisi molecolare con i risultati citologici, attraverso l'analisi statistica di tipo multivariato, emerge un OR di 19,8 (p=0; IC95% 7,2-54,4%) tra presenza virale e lesioni citologiche.

Più in particolare, il rapporto tra lesioni citologiche e genotipo HPV16 è evidenziato da un OR statisticamente significativo di 6,6 (p=0,001 IC95% 2,2-20%), mentre pur in presenza di OR pari a 2 e 1,9, l'associazione tra lesioni citologiche e presenza di genotipi HPV18 e HPV51 non ha raggiunto la significatività statistica (Tab. 12).

VARIABILI	OR	p	IC 95%
Lesioni citologiche	19,8	0	7,2-54,4
Lesioni citologiche con HPV18	2	0,5	0,2-17,9
Lesioni citologiche con HPV51	1,9	0,2	0,7-5,1
Lesioni citologiche con HPV16	6,6	0,001	2,2-20

Tab.12 : Risultati dell'analisi di regressione logistica univariata.

5. CONSIDERAZIONI

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

- la prevalenza per l'infezione cervicale da HPV riscontrata nel campione analizzato risulta essere 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 particolare interesse è la elevata proporzione delle coinfezioni che sono sostenute prevalentemente 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, l'HPV16 è risultato essere il genotipo 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 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;
- 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%)³².
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;
- la carica virale, così come già evidenziato in altri studi, può rappresentare un utile *marker* surrogato di attività replicativa del virus dando, così, utili informazioni sulla persistenza o meno dell'infezione. Tuttavia, per una ottimale correlazione tra infezione

virale e lesione citologica e conseguente definizione di accurate misure del rischio, sarebbe opportuno implementare il campione da analizzare soprattutto per le pazienti con elevato grado di lesione o con carcinoma infiltrante;

- lo studio retrospettivo ha evidenziato un'elevata prevalenza genotipo HPV16 e 51, minore circolazione del genotipo 18, risultati che confermano quelli ottenuti durante nell'indagine *cross sectional* facendo supporre che nel corso degli anni sia rimasto stabile la circolazione dei genotipi ad alto rischi. Gli elevati valori di prevalenza dell'HPV51, aspetto peraltro già segnalato in recenti studi italiani 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 una peculiarità epidemiologica del nord Sardegna;
- i risultati ottenuti sia dall'indagine *cross-sectional* che da quella retrospettiva sono indicativi della necessità di sorvegliare nel tempo la

circolazione degli HPV nei diversi territori. Infatti, la recente campagna di immunoprofilassi con l'utilizzo di vaccini, che conferiscono protezione nei confronti di HPV16 e HPV18, potrebbe portare nel tempo ad un *replacement* con sostituzione dei genotipi oggi maggiormente circolanti con altri di minor diffusione. 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.

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; 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) Broker Tr., Jin G., Croom-Rivers A., Bragg S.M., Richardson M., Chow L.T., et al. Viral latency-the papillomavirus model. *Dev Biol (Basel)* 2001;106:443-51.
- 5) 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.

- 6) Burk RD et al. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 1996; 174(4):679-89.
- 7) Butz K., Hoppe-Seyler F. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol*. 1993; 67(11):6476-86.
- 8) Cai T., Mazzoli S., Mondaini N., Bartoletti R., Moonen P. M. J., Bakkers J., Lambertus A.L.M., Kiemenay. et al. Human Papilloma Virus DNA and p53 mutation analysis on bladder washes in relation to clinical outcome of bladder cancer. *Eur Urol* 2007;52:464-9.
- 9) Capri S., Bamfi F., Marocco A., Demartean N. Impatto clinico ed economico della vaccinazione anti-HPV. *Ital J Public Health* 2007; 4(2Suppl): 36-54.
- 10) 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.

- 11) De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20; 324(1):17-27. Review.
- 12) Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2001;101:525-41.
- 13) Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15. Review.
- 14) Doorbar, et al. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110(5):525-41. Review.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Gene Bank, BLAST, FASTA, Primer express; ESSA; (<http://genebee.msu.su>; <http://tbi.univie.ac.at>).

- 18) Giroglou T., Florin L., Schafer F., Streeck R.E. and Sapp M. Human papilloma virus infection requires cell surface heparan sulphate. *J Virol.* 2001; 75(3):1565-70.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Howell-Jones R. Human papillomavirus vaccination: the United Kingdom's recommendation and update on European licensure and efficacy data. *Euro Surveill.* 2007; 12(11):E071115.4. Review.
- 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) Joyce J.G., Tung J.S., Przysiecki C.T., Cook J.C., Lehman E.D., Sands J.A. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem; the journal of biological chemistry*; Vol. 274: 5810-5822.
- 25) 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.
- 26) Kesis T.D., Connolly D.C., Hedrick L. and Cho K.R. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* 1996;13:427-431.
- 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) Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck SCCs worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers prev* 2005;14: 467-75.

- 29) Kurvinen K., Yliskoski M., Saarikoski S., Syrjanen K. and Syrjanen S. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Cancer Eur.* 2000; 36: 1402-1410.
- 30) La Torre G., de Waure C., Chiaradia G., Mannocci A., Ricciardi W. HPV vaccine efficacy in preventing persistent cervical HPV infection: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine.* 2007;25(50):8352-8.
- 31) 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;72(1):132-7)
- 32) Mackay IM, Arden KE, Nitsche "A Real-time PCR in virology." *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305. Review.
- 33) Marocco A., Mannocci A., Capri S., La Torre G. Analisi dei costi del ricorso alle risorse sanitarie per la prevenzione e il trattamento del carcinoma della cervice uterine. *Ital J Public Health* 2007; 4(2Suppl): 17-21.
- 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) Moonen P.M., Bakkers J.M., Kiemeney L.A., Schalken J.A., Melchers W.J., Witjes, J.A. Human papilloma virus DNA and p53 mutation analysis on bladder washes in relation to clinical outcome of bladder cancer. *Eur Urol* 2007;52:468-9.

36) Muñoz N, Castellsaguè X, Berrington de Gonzàles, Gissman L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24(3):1-10.

37) 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.

38) http://www.osservatorionazionale screening.it/ons/pubblicazioni/rapporto5/indicatori_cervice.pdf.

Fig. 7. Questionario epidemiologico.

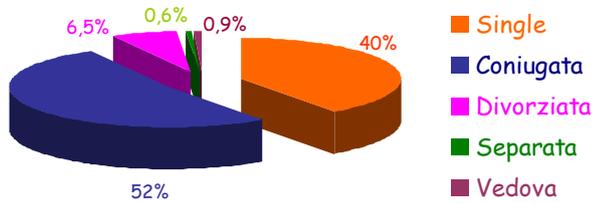
 UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI	N. CODICE
Istituto di Igiene e Medicina Preventiva "P. Marghiesu" (Direttore: Prof. ^{ma} Elena Marosa)	Dipartimento di Farmacologia, Ginecologia e Ostetricia Sezione di Ginecologia e Ostetricia (Direttore: Prof. Salvatore Denzale)
Studio epidemiologico sull'infezione da Papilloma virus (HPV) nella popolazione del Nord-Sardegna	
1. Età in anni _____	
2. Residenza _____	
3. Professione _____	
4. Titolo di studio 1 ^o elementare 2 ^o licenza media 3 ^o superiori 4 ^o laurea	
5. Stato coniugale 1 ^o coniugata 2 ^o divorziata 3 ^o vedova 4 ^o single	
6. Etnicità 1 ^o caucasica 2 ^o africana 3 ^o asiatica 4 ^o americana	
7. Abitudine al fumo 1 ^o mai 2 ^o ex 3 ^o attuale	
8. Parità 1 ^o 0 2 ^o 1-2 3 ^o 3-4 4 ^o 5-13	
9. Uso contraccettivi orali 1 ^o mai 2 ^o ex 3 ^o attuale	
10. Utilizzo preservativi maschili 1 ^o mai 2 ^o in passato 3 ^o attuale	
11. Età in anni del primo rapporto _____	
12. Totale partners sessuali 1 ^o 1 2 ^o 2-3 3 ^o 4-9 4 ^o >10	
13. Nuovi partners negli ultimi 3 mesi 1 ^o nessuno 2 ^o 1 3 ^o 2-60	
14. Storia di infezioni sessualmente trasmesse 1 ^o si 2 ^o no	
15. Quali _____	
16. Pap test negli ultimi 3 anni 1 ^o si 2 ^o no	

Fig. 8. Statistiche descrittive del campione.

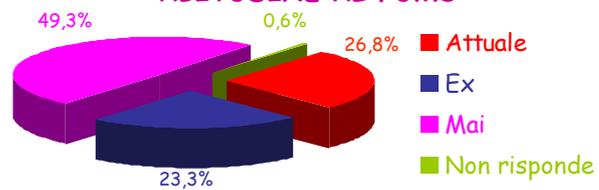


Fig. 9. Statistiche descrittive del campione.

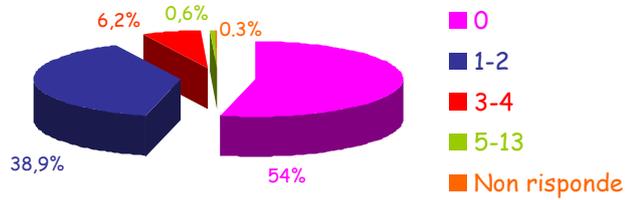
STATO CONIUGALE



ABITUDINE AL FUMO



**Fig. 10. Statistiche descrittive del campione.
PARITÀ**



USO CONTRACCETTIVI ORALI

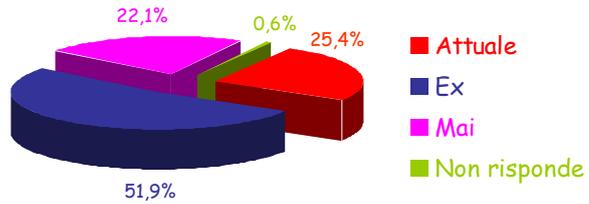
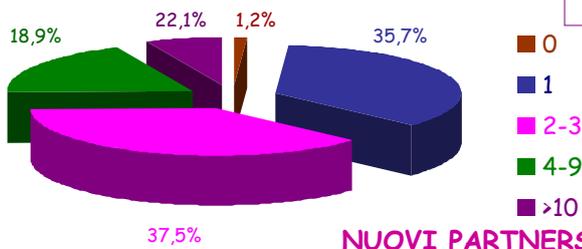


Fig. 11. Statistiche descrittive del campione.

TOTALE PARTNERS SESSUALI



Età primo rapporto sessuale

Media	D.S.
19 anni	3,4 anni

NUOVI PARTNERS NEGLI ULTIMI 3 MESI

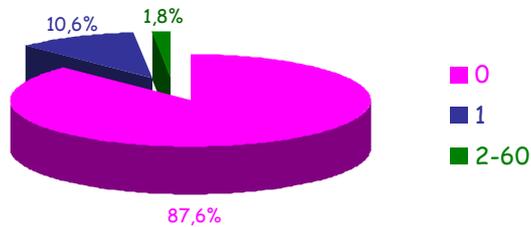
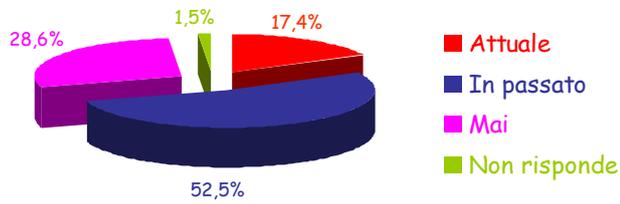


Fig. 12. Statistiche descrittive del campione.

USO PRESERVATIVI



STORIA DI INFEZIONI SESSUALMENTE TRASMESSE

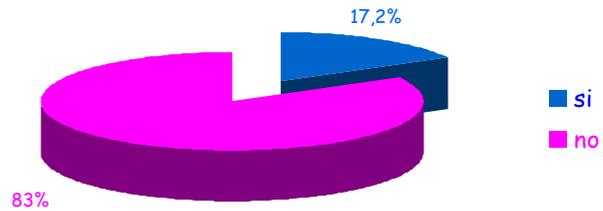


Fig. 13. Statistiche descrittive del campione.

PAP TEST NEGLI ULTIMI 3 ANNI

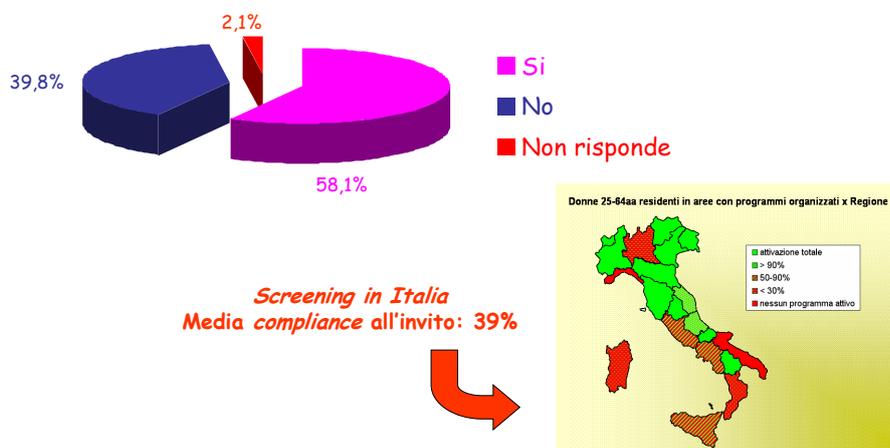


Fig. 14. Prevalenza dell'infezione da HPV.

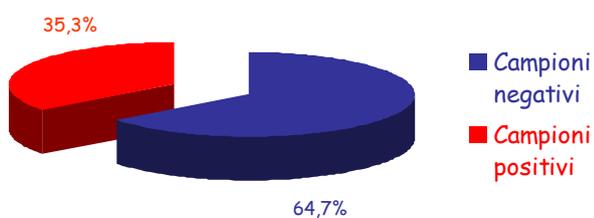


Fig. 15. Prevalenza HPV per fasce di età.

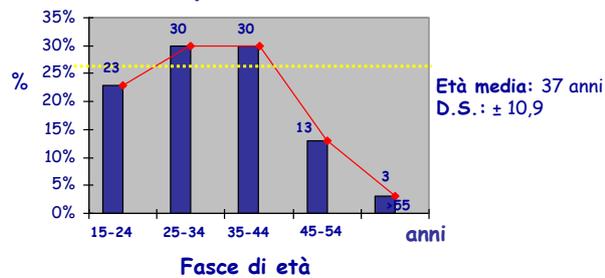


Fig. 16. Prevalenza HPV-HR per fasce di età.



Fig. 17. Prevalenza dell'infezione da HPV.

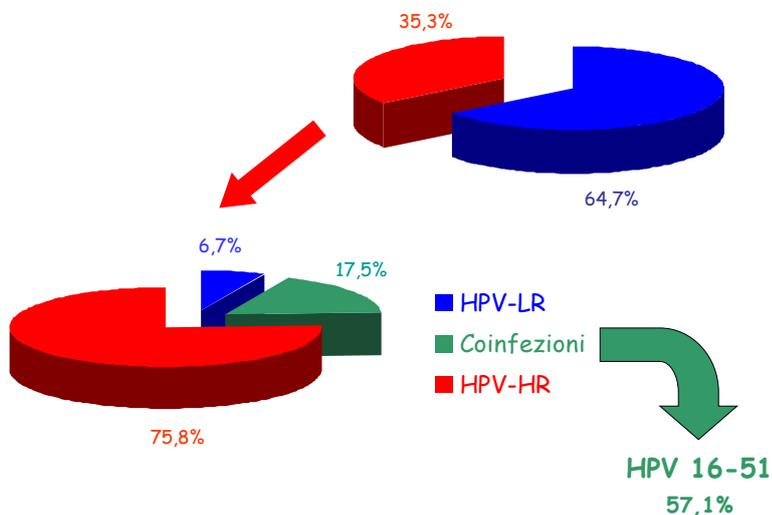


Fig. 18. Prevalenza genotipi HPV.

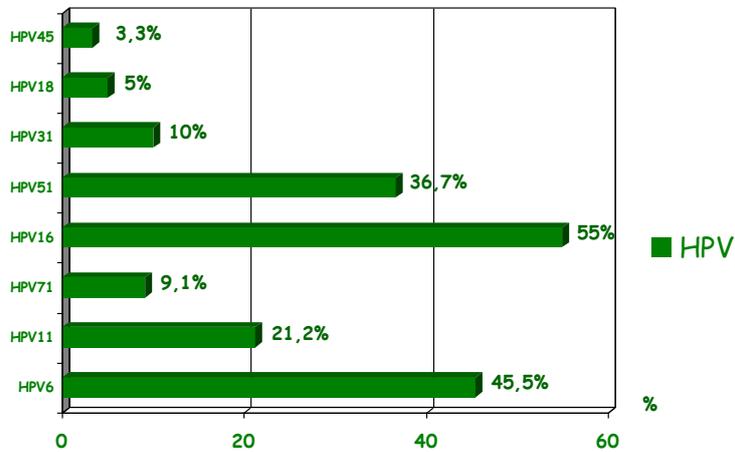


Fig. 19. Prevalenza genotipi HPV ad alto rischio.

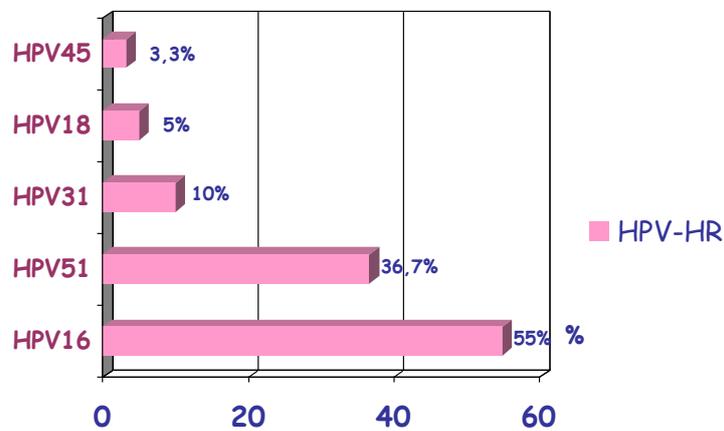


Fig. 20. Prevalenza genotipi HPV a basso rischio.

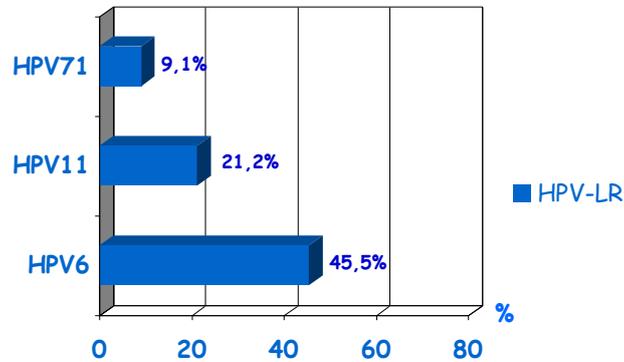


Fig. 21. Risultati esame citologico.

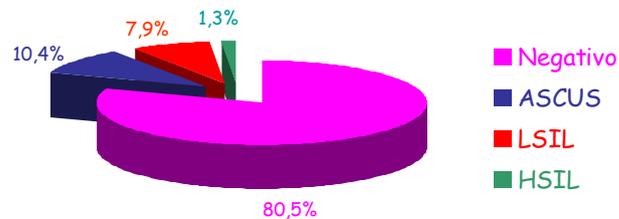


Fig. 22. Risultati analisi retrospettiva.

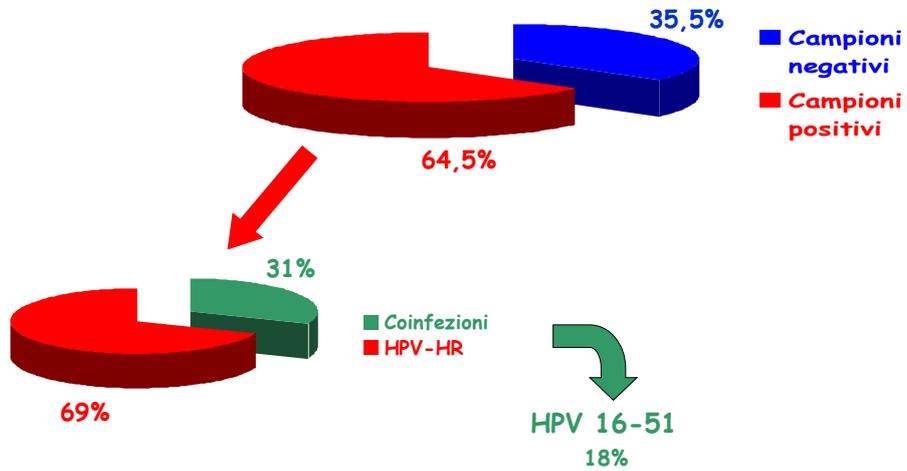


Fig. 23. Risultati analisi retrospettiva.

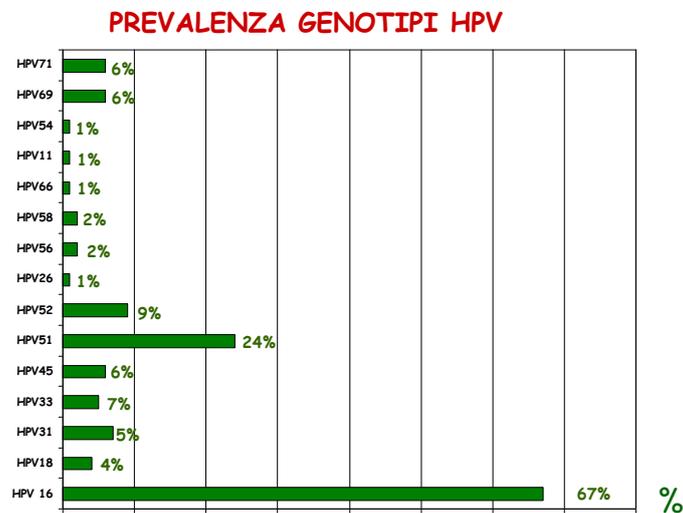


Fig. 24. Risultati analisi retrospettiva.

PREVALENZA GENOTIPI HPV AD ALTO RISCHIO

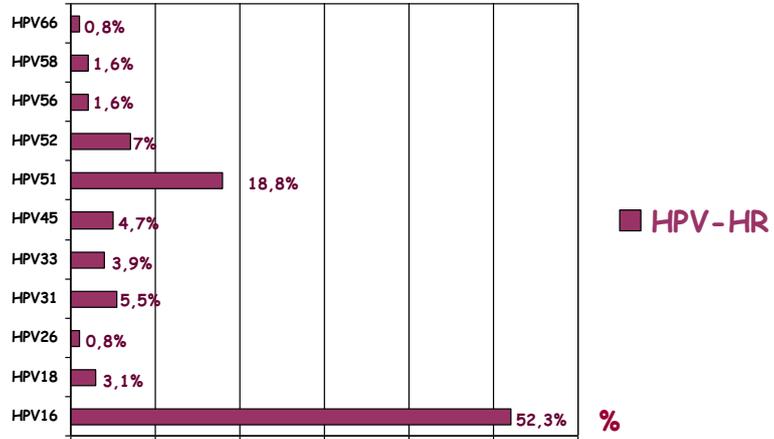


Fig. 25. Risultati analisi retrospettiva.

PREVALENZA GENOTIPI HPV IN PAZIENTI CIN1

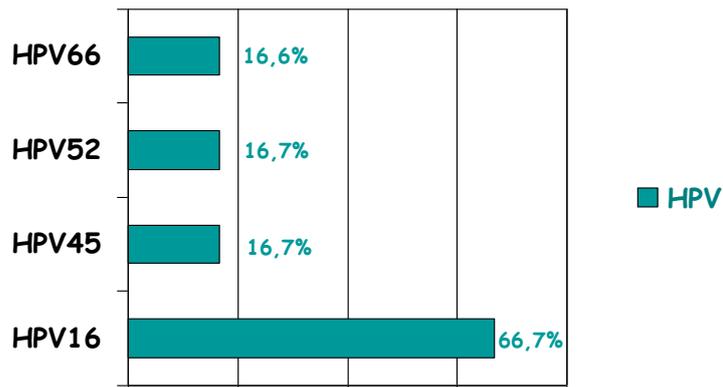


Fig. 26. Risultati analisi retrospettiva.

PREVALENZA GENOTIPI HPV IN PAZIENTI CIN2

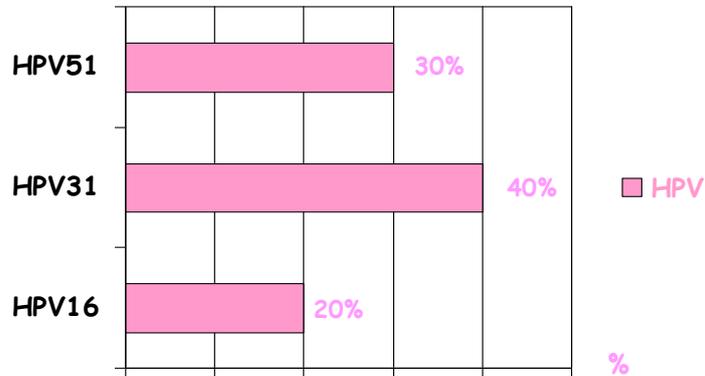


Fig. 27. Risultati analisi retrospettiva.

PREVALENZA GENOTIPI HPV IN PAZIENTI CIN3

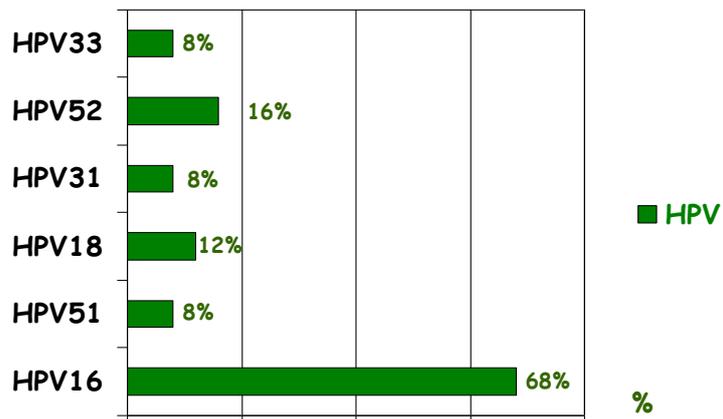


Fig. 28. Risultati analisi retrospettiva.

PREVALENZA GENOTIPI HPV IN PAZIENTI CON CARCINOMA INFILTRANTE

